

閉塞性腎症における
ニコランジルの効果に関する検討

ます なが あや こ
升 永 綾 子

(泌尿器科学専攻)

防衛医科大学校

平成30年度

目 次

第1章 緒言	4 頁
第2章 ニコランジルの腎のNO産生に対する効果	7 頁
第1節 背景	7 頁
第2節 対象および方法	7 頁
第3節 結果	9 頁
第4節 考察	10 頁
第5節 小括	11 頁
第3章 閉塞性腎症における腎線維化、尿細管アポトーシス、炎症細胞浸潤に対するニコランジルの効果	12 頁
第1節 背景	12 頁
第2節 対象および方法	12 頁
第3節 結果	17 頁
第4節 考察	21 頁
第5節 小括	23 頁
第4章 ニコランジルのTGF- β に対する影響	25 頁
第1節 背景	25 頁
第2節 対象および方法	25 頁
第3節 結果	27 頁
第4節 考察	27 頁

第5節 小括	28頁
第5章 ニコランジルの抗酸化作用に対する影響	29頁
第1節 背景	29頁
第2節 対象および方法	30頁
第3節 結果	33頁
第4節 考察	33頁
第5節 小括	35頁
第6章 統括的考察	36頁
第7章 結論	43頁
謝辞	44頁
引用文献	45頁
図	51頁

第1章 緒言

閉塞性腎症(Unilateral Ureteral Obstruction; UUO)とは、尿管の通過障害により起こる水腎症が原因で腎間質の線維化をきたし、さらに線維化が進むと腎機能が低下し、最終的には腎機能の廃絶に至る病態である。尿管の通過障害は、尿管結石、泌尿器科癌、消化器癌、婦人科系疾患、後腹膜線維化症などの様々な原因により起こり、泌尿器科の日常診療において非常に多く遭遇する問題である。尿管が閉塞すると、尿細管腔が拡張し尿細管内圧の上昇が起こり、尿細管細胞や炎症細胞から放出された TGF- β などのメディエーターの上昇により尿細管アポトーシス(1)や腎間質の線維化が起こる(2)。日常臨床においては腎機能を温存するために腎瘻造設や尿管ステント挿入などを行い尿路の通過障害を解除すれば腎障害の悪化を防ぐことができると考えられている。しかし尿管閉塞の解除後も腎間質障害の進行が続いていることが動物モデルで報告されている(3)。このため機能するネフロンを温存し、腎障害を最小限に抑えるために、尿路の閉塞時および閉塞の解除後に何らかの治療介入が必要となる。しかし現時点では、UUO の治療薬として臨床応用されている薬剤は無く、有用な治療法の開発、導入が急務と考えられる。

UUO による腎間質障害や尿細管アポトーシスは、アンギオテンシン II (4, 5)、TGF- β (2, 6)、炎症性細胞浸潤(7, 8)、酸化ストレス(9, 10)などの様々な要因が関連しているものと考えられている。UUO による腎障害の進行のメカニズムが解明されるに伴い、治療法として様々なアプローチが試みられてきた。薬理学的アプローチとして、ACE 阻害薬(11)、アンギオテンシン受容体拮抗薬(ARB)(5)、HMG-CoA 還元酵素阻害薬(12)、抗 TGF- β 抗体や TGF- β の産生を抑制する薬剤(6, 13)、Cox-2 阻害薬(14)、nitric oxide

(NO) donor (腎臓内の NO 産生を増加させる薬剤) (15, 16)、抗酸化薬(10)などが動物実験に用いられ、UUO による腎障害を抑制する効果が証明されてきた。今後の臨床応用を念頭においた場合、副作用が少なく安価である薬剤であれば使用しやすい。さらに他の疾患において臨床的にすでに用いられている薬剤であれば、投与に伴い起こりうる副作用も確認されており UUO 治療への臨床応用も行いやすいと考えられる。

今回我々は、UUO に対するニコランジルの効果について検討した。ニコランジルは狭心症の治療薬として、臨床的に広く使用されている経口投与できる薬剤である。ニコランジルは血管平滑筋における ATP 感受性 K⁺ channel opener としての作用(17, 18)、また血管平滑筋細胞の NO 産生を高める作用があり(19, 20)、これらの作用により血管が弛緩し、冠動脈の血流を改善する。ニコランジルは心筋(21)、脾(22)や膀胱(23)など様々な臓器の疾患モデルにおいて臓器保護作用が報告されており、様々な腎障害モデルにおいても腎保護作用が証明されている。例えば、抗 Thy-1 (CD90) 抗体によるラット糸球体腎炎モデル(24)や、ラット腎虚血再灌流モデル(25)において腎障害を改善することが証明されている。

ニコランジルには、UUO の治療において魅力的な作用がある。抗 Thy-1 (CD90) 抗体によるラット糸球体腎炎モデルにおいて、腎組織内の TGF- β を減じる作用が報告されている(24)。また、ニコランジルには NO 供与剤としての作用があり、様々な腎疾患モデルにおける腎保護作用が報告されるにとどまらず、臓器の NO 産生を高めることによりドキシソルビシンによる心毒性を改善する作用(26)や、過活動膀胱ラットモデルでの膀胱収縮圧や収縮間隔の改善作用(23)などが報告されている。さらに、ニコランジルには、抗酸化剤としての作用もあり、ラットの腎虚血再灌流モデル(25)や糖尿病ラットの

脾障害モデル(22)において酸化ストレスを減じる作用により臓器障害を軽減することが証明されている。

このようにニコランジルは NO 供与剤としての作用、TGF- β 産生抑制作用、抗酸化作用を有することから、我々は UUO の治療薬として有用であるという仮説を立てた。この仮説を検証するために、ラット UUO モデルにニコランジルを投与し、腎 NO の産生、TGF- β 産生に与える影響、腎間質の線維化、尿細管アポトーシスおよび炎症性細胞浸潤に対する影響、抗酸化作用について検討を行った。

第 2 章では、ラットにニコランジルを投与した時の、腎臓の NO 産生に対する効果を検討した。次いで第 3 章では、ラット UUO モデルにニコランジルを投与し、腎重量、間質の線維化、尿細管アポトーシス、炎症性細胞浸潤に与える影響などについて検討した。また、eNOS や iNOS の発現についても免疫組織学的に検討を行った。第 4 章では、ラット UUO モデルにおいてニコランジルが腎の TGF- β 1 産生に与える影響について検討した。第 5 章では、ラット UUO モデルにおけるニコランジルの抗酸化作用について検討を行った。

第2章 ニコランジルの腎の NO 産生に対する効果

第1節 背景

ニコランジルは、狭心症治療に用いられる冠動脈拡張剤である。血管内皮細胞の endothelial NOS (eNOS) の発現上昇を介して組織中の NO 産生を高めることが冠拡張作用の機序の 1 つとされている。また NO には血管拡張作用のみならず臓器の線維化を抑制する作用、炎症性細胞浸潤を抑制する作用が報告されている(27, 28)。循環器領域において、心血管イベントの減少や、心筋保護作用などが報告されている(26, 27, 29, 30)。さらに基礎研究においては、腎臓の NO 産生を高めることにより様々な腎疾患モデルにおいて腎障害を抑制することが報告されてきた(31, 32)。共同研究者の過去の報告においても、UUO モデルにおける腎 NO を高める治療の有用性について報告してきた(15, 16, 33)。一方、*N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) は、NOS の作用を阻害するアルギニン誘導体であり、NO 供与剤を用いた様々な研究において腎 NO 産生を抑制することが確認されてきた(15, 16)。

本章では、ニコランジルが腎 NO の産生に与える影響について検討した。

第2節 対象および方法

(1) 薬剤

ニコランジル、*N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)、*N*-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride、Sulphanilamide、Copper(II) sulphate、Sodium

nitrate は、シグマアルドリッチジャパン合同会社（東京都品川区）から購入した。

Dimethyl Sulfoxide (DMSO)、リン酸（濃度 85%）、塩酸、カドミウム(cadmium metal) は、富士フィルム和光純薬株式会社（大阪府大阪市）から購入した。

ニコランジルは dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し、10 mg/ml とした。-20℃で保管し、使用時には 0.9%生理食塩水で希釈し 5mg/ml とした。L-NAME は生理食塩水に溶解し、10 mg/ml として使用した。

（2）尿中 NO 量の測定

7 週齢の SD/SPF ラット（メス）を日本クレア株式会社（東京都目黒区）から購入した。ニコランジル投与による腎臓 NO の産生および L-NAME による NO 産生の抑制を確認するために以下の 3 群で実験を行った。コントロール群(n=14)では、DMSO を生理食塩水で 50%に希釈し、0.2 ml を腹腔内注射した。ニコランジル群(n=14)では、ニコランジル 5 mg/kg を腹腔内投与した。ニコランジル+L-NAME(NL)群(n=14)ではニコランジル 5 mg/kg を腹腔内注射し、L-NAME に関しては 50 mg/kg を皮下投与した。

それぞれの薬剤を 3 日間投与し、最終日にラット代謝ケージ（株式会社夏目製作所、東京都文京区）を用いて 24 時間尿の採取を行った。採尿用のフラスコには尿中の細菌の増殖を抑制するために、イソプロパノールを 3 ml 加えた。検体は攪拌後 6,000 rpm で 1 分間遠心分離し、上澄みのみを-80℃で保存した。

ラット尿中 NO は NO₂ または NO₃ の形で存在するが、Griess 反応(16)によって NO₂/NO₃ を全て NO₂ とし、NO₂ の吸光度を測定した。実験方法を以下に述べる。カドミウムを 5 %塩酸で 3 度洗浄し、さらに蒸留水で洗浄した後、蒸留水を除去し、そこに

5% 硫酸銅を加え 25 秒放置した後に、硫酸銅溶液を廃棄した。カドミウムを蒸留水で洗淨し、使用時まで 5%塩酸中に保存した。また Griess 溶液として溶液 A（0.1%の N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride）と溶液 B（5%リン酸に溶解した 1%の sulfanilamide）を作成した。Griess 溶液は測定直前に溶液 A と溶液 B を 1 : 1 で混合し使用した。

尿検体を蒸留水で 5 倍に希釈し、銅化したカドミウム 100 mg と希釈尿 500 μ l をエッペンドルフチューブ内で 30 分間室温で反応させた。6,000 rpm で 1 分間遠心分離し、この希釈尿の上澄みのみを検査に使用した。この希釈尿 300 μ l に Griess 液 150 μ l（溶液 A 75 μ l と溶液 B 75 μ l）を加え、50°Cのウォーターバスで 5 分間反応させた。マイクロプレートリーダー（和光純薬工業株式会社）にて 570 nm で吸光度を測定した。

（3）統計学的解析

平均値の誤差には標準誤差を用いた。2 群間の比較は、Mann-Whitney *U* test で検定した。検定には JMP14（SAS Institute Japan 株式会社、東京都港区）を使用した。 $p<0.05$ をもって統計学的に有意とした。

第3節 結果

ニコランジル投与の尿中 NO への影響を調べるために、コントロール群、ニコランジル群、NL 群の 3 群で 24 時間尿中 NO の測定を行った。ニコランジル群ではコントロール群と比較し、ラット 100 グラムに換算した 24 時間尿中の NO 産生量が有意に多かった（ 514.1 ± 47.0 vs. 262.9 ± 26.5 μ mol/24 hours per 100gm, $p=0.0004$ ）。さらに NL 群で

は、ニコランジル群と比較し NO 産生量が有意に少なかった($360.2 \pm 39.0 \mu\text{mol}/24 \text{ hours}$ per 100gm, $p=0.0159$ vs. ニコランジル群) (図 1)。

第 4 節 考察

本章では、まず尿管閉塞を伴わないラットにおいてニコランジルが腎 NO の産生に与える影響について検討した。共同研究者の過去の研究において、L-アルギニンの経口投与によりラット尿中 NO 量が上昇すること(15)、アドレノメデュリンの腹腔内投与によりマウス尿中の NO 量が上昇すること(16)を報告してきた。L-アルギニンは NOS の基質であるため、基質の増加により NO が増加する。またアドレノメデュリンの投与においては、血管内皮細胞の eNOS の上昇により腎 NO 産生を高める効果がある。また Tashiro らは、ラット高血圧モデルにおいて、ニコランジル投与により尿中 NO の上昇を認めたことを報告している(32)。今回も代謝ケージを用い 24 時間尿を収集し、Griess 反応を用いて NO 量を測定した。尿中 NO 量はニコランジル投与群において、コントロール群と比較し有意に上昇することが確認された。この効果は非特異的 NOS 阻害薬である L-NAME により有意に抑制された。腎尿細管細胞は尿管閉塞のない定常の状態において iNOS や eNOS を発現しており、NOS 阻害薬である L-NAME の投与はこれらの NOS の作用を阻害し、腎 NO 産生を抑制することが示唆されている(15)。今回は L-NAME 単独投与群については検討していないが、過去の UUO モデルの報告において、L-NAME の単独投与はコントロール群と比較して尿中の NO 量が低下することが確認されている(15, 34)。本研究では NL 群において、ニコランジル投与に非特異的 NOS 阻害薬である L-NAME を併用することにより、ニコランジル群と比較して尿中の NO が

有意に低下した。この実験結果は、ニコランジル投与による健常腎臓（閉塞を伴わない腎臓）における NO 産生の上昇には何らかの NOS（サブタイプは特定できないが）の効果が関連していることを示すものである。但し、L-NAME の投与により尿中 NO はコントロール群のレベルまでは低下しておらず、今回の L-NAME の投与量では腎臓の様々な細胞（血管内皮細胞、尿細管、マクロファージなど）に存在する NOS 全体の作用をコントロールレベルまでは抑制できなかったものと考えている。

第 3 章においては UUO 作成の 2 日前からニコランジルを投与するが、尿管閉塞時にはニコランジルにより既に腎 NO が上昇していると考えられる。

第 5 節 小括

ニコランジルの投与は、尿管閉塞を伴わない腎臓における NO の産生を高めることが示された。この効果は L-NAME により有意に抑制されることから NOS が関与していることが示唆された。

第3章 閉塞性腎症における腎線維化、尿細管アポトーシス、炎症細胞浸潤に対するニコランジルの効果

第1節 背景

閉塞性腎症により起こる代表的な組織学的変化は、尿細管アポトーシス、間質の線維化、そして炎症細胞浸潤である。第2章ではニコランジルの投与が腎臓における NO 産生を高める作用があることが確認した。腎 NO の産生を高めることで、UUO による腎障害を抑制されることを我々は報告してきた(15, 16)。ニコランジルは腎 NO の産生を増加させることができることから、閉塞性腎症の治療薬の候補となりうる。第3章では、ラット UUO モデルにおいて、ニコランジル投与による間質線維化、尿細管アポトーシス、炎症細胞浸潤に対する効果について検討した。また、腎組織における nitric oxide synthase (NOS)の発現についても検討した。

第2節 対象および方法

(1) 薬剤

ニコランジルおよび L-NAME は、シグマアルドリッチジャパン合同会社（東京都目黒区）から購入した。ニコランジルは DMSO に溶解し、10 mg/ml とした。-20℃で保管し、使用時には 0.9%生理食塩水で希釈し 5mg/ml とした。L-NAME は生理食塩水に溶解し、10 mg/ml とした。Dimethyl Sulfoxide (DMSO)、二クロム酸カリウム、トリクロロ酢酸、エタノール、塩化第二鉄、塩酸、リンタングステン酸、オレンジ G、アニリン

ブルー、キシレン、エタノール(99.5)は富士フィルム和光純薬株式会社（大阪府大阪市）から購入した。ヘマトキシリン、酸フクシン Rubin S はメルク株式会社（東京都目黒区）から購入した。酢酸、アゾフロキシンは関東化学株式会社（東京都中央区）から購入した。Xylidine Ponceau は Waldeck GmbH & Co.KG (Münster, Germany)から購入した。Phosphate-Buffered Salines (PBS) (10x), pH 7.4 は、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社（東京都港区）から購入し、使用時には脱イオン水で 10 倍希釈し 1x とした。10%ヤギ血清、ヒストファインシンプルステインラット MAX-PO (MULTI)（ラット組織用 マウス・ウサギ第一抗体両用）、シンプルステイン DAB 溶液は、株式会社ニチレイバイオサイエンス（東京都中央区）から購入した。マイヤーヘマトキシリンは武藤化学株式会社（東京都文京区）から購入した。Target Retrieval Solution, pH 9、Peroxidase-Blocking Solution、抗 FSP-1 (S100A4)抗体は、Dako (Carpinteria, CA, USA)から購入した。抗 ssDNA 抗体は、タカラバイオ株式会社（滋賀県草津市）から購入した。抗 CD68 (ED1)抗体、抗 NOS 2 抗体 (induced NOS; iNOS)及び抗 NOS 3 抗体 (endothelial NOS; eNOS)は、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)から購入した。

（２）ラットの閉塞性腎症（UUO）モデル

UUO モデルの作成について述べる。麻酔はペントバルビタール（50mg/ml）0.2 ml による腹腔内注射で行った。腹部正中切開し、腸管を正中に圧排すると左腎臓が確認できる。腎門部の血管を確認し、腎門部から尾側に向かって走行する左尿管を確認する。左

尿管の周囲を剥離した後、尿管を 3-0 絹糸を用い 2 ヲ所で結紮した。最後に腹部正中創を 2-0 絹糸で縫合した。閉腹後、ラットを保温シートで温め、覚醒するまで観察した。

(3) UUO モデルにおける薬物の投与および腎採取

8 週齢の SD/SPF ラット (メス) を用いた。コントロール群、ニコランジル群、NL 群 (ニコランジル+L-NAME) 群の 3 群での実験を行った。すべての群において、UUO 作成 2 日前から、作成後 13 日目まで、連日の薬剤投与を行った。コントロール群 (n=11) では DMSO を生理食塩水で 50% に希釈し、0.2 ml を腹腔内注射した。ニコランジル群 (n=8) ではニコランジル 5 mg/kg (0.2 ml に調整) を腹腔内注射した。NL 群 (n=10) ではニコランジル 5 mg/kg (0.2 ml に調整) を腹腔内投与し、さらに L-NAME 50 mg/kg を皮下投与した。14 日目に麻酔下に両側腎の採取を行った。ペントバルビタール (50 mg/ml) 0.3 ml を腹腔内注射し麻酔を行った後、腹部正中切開で腎臓にアプローチした。左腎をまず採取し、続いて右腎を採取した。次に下大静脈から血液を約 2 ml 採取した。創部を 2-0 絹糸で閉創した。ラットはペントバルビタールで安楽死させた。腎検体は冠状断で 2 分割し、次に腎門部から生理食塩水を注入して軽く洗浄した。水分を可及的にガーゼで拭き取った後に、腎臓の重量を測定した (wet weight)。二分割した腎臓の 1 つはパラフィン包埋切片作成用に 10%ホルマリンで固定した。もう一つの 2 分割標本は、さらに 3 分割にしてエッペンドルフチューブに挿入し-80℃で保存した。ホルマリン固定した検体は、24 時間後にパラフィン包埋を行った。

(4) 間質線維化の評価

Masson's trichrome 染色で評価した。腎組織のパラフィン包埋ブロックを厚さ 4 μ m で薄切し、パラフィン包埋切片を作成した。切片が固定されたプレパラートをキシレン及びエタノールで処理（100%キシレン 5 分×3 回、100%エタノール 5 分×2 回、80%エタノール 5 分×1 回）しパラフィンを除去し、流水で 10 分間水洗した。媒染剤（10% 重クロム酸カリウムと 10%トリクロロ酢酸を 1:1 で混合したもの）で 3 時間処理した。1 時間流水で洗浄し、鉄ヘマトキシリン液（I 液と II 液を 1:1 で混合したもの。I 液：ヘマトキシリン 2g, エタノール 99.5 180ml, 脱イオン水 10ml、II 液：塩化第二鉄 4g, 脱イオン水 190ml, 25%塩酸 2ml）内で 15 分間放置した。1%塩酸アルコール（塩酸 30ml, エタノール 99.5% 2100ml, 脱イオン水 900ml を混合し作成）に背景が白くなるまで放置し、流水で洗浄した。リントングステン酸モリブデン液（2.5%リントングステン酸と 2.5%リンモリブデン液を 1:1 で混合したもの）で 15 秒間処理し、流水で洗浄した。0.75%オレンジ G 液（オレンジ G 3.75g, 脱イオン水 500ml, 酢酸 10-15 滴）内に 1 分間放置し、1%酢酸水で処理し、マッソン液（Xylydine Ponceau 0.6g, 酸フクシン Rubin S 0.2g, 脱イオン水 500ml, 酢酸 1.0ml）内に 30 分間放置した。1%酢酸水に通し、2.5%リントングステン酸液内に放置した（5 分間×2）。1%リントングステン酸液で処理し、アニリン青（アニリンブルー0.4g, 脱イオン水 100ml, 酢酸 8ml を混合し、使用時に 2 倍希釈する）内に 3 分間放置した。1%酢酸水で 2 回処理し、3 槽目で 5 分間放置した。キシレン及びエタノールで脱水、透徹（80%エタノール 5 分、100%エタノール 5 分×2 回、100%キシレン 5 分×3 回）し、封入した。青く染色された部分を point counting 法を用いて評価した。400 倍視野、100 マス中で青が含まれるマス数をカウ

ントした。1 検体につき 10 視野（皮質 5 視野、髄質 5 視野）カウントし、平均値を算出した。

（５）免疫組織染色および評価方法

腎組織のパラフィン包埋ブロックを厚さ 4 μ m で薄切し、パラフィン包埋切片を作成した。切片が固定されたプレパラートをキシレン及びエタノール（100%のキシレン 5 分×3 回、100%エタノール 5 分×2 回、80%エタノール 5 分×1 回）で処理しパラフィンを除去した。流水で 10 分間洗浄後、Dako Target Retrieval solution (pH 9)を用いて、95℃で抗原賦活化を行った。賦活化の至適時間は抗体の種類により異なり 40～50 の間であった。ssDNA 染色の場合のみ賦活化処理を省略した。Dako peroxidase blocking reagent により、10 分間、内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った。次に 10%正常ヤギ血清で室温、60 分でブロッキングを行った。抗 FSP-1 抗体（Dako）（1 対 100 に PBS で希釈）、抗 ssDNA 抗体（タカラバイオ株式会社）（1 対 200 に PBS で希釈）、抗 CD68 抗体（Santa Cruz Biotechnology, Inc.）（1 対 75 に PBS で希釈）、抗 NOS 2 抗体（Santa Cruz Biotechnology, Inc.）（induced NOS, 1 対 100 に PBS で希釈）及び抗 NOS 3 抗体（Santa Cruz Biotechnology, Inc.）（endothelial NOS, 1 対 200 に PBS で希釈）を用い、それぞれ 100 μ l をプレパラートに加え、湿潤下に 4℃で一晩放置した。2 次抗体は Simple Stain Max PO（ニチレイバイオサイエンス）を用い、1 時間室温で放置した。3,3'-Diaminobenzidinetetrahydrochloride（シンプルステイン DAB 溶液、ニチレイバイオサイエンス）で 2 分発色させ、後染色はマイヤーヘマトキシリン染色液（武藤化学株式会社）で 1 分間放置した。流水で 3 分間洗浄後、エタノール及びキシレンで脱水（80%エ

タノール 5 分間×1 回、100%エタノール 5 分間×2 回、100%キシレン 5 分間×3 回) し、封入した。抗 FSP-1 抗体、抗 ssDNA 抗体、抗 CD68 抗体について、400 倍視野で陽性細胞数をカウントした。1 検体につき 10 視野 (皮質 5 視野、髄質 5 視野) でカウントし、平均値を算出した。

(6) 統計学的解析

平均値の誤差には標準誤差を用いた。2 群間の比較は、Mann-Whitney *U* test で検定した。検定には JMP14 (SAS Institute Japan 株式会社、東京都港区) を使用した。 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意とした。

第 3 節 結果

(1) 腎重量 (wet weight)

検体採取時に、各ラットの体重、閉塞腎、非閉塞腎の重さを測定し、腎の重さ(mg)/体重(g body weight=g BW)を算出した。測定方法は対象と方法に記載した。ニコランジル群とコントロール群との比較において、閉塞腎重量 (5.65 ± 0.22 vs 5.21 ± 0.27 mg/g BW, $p = 0.302$) および非閉塞腎重量(4.32 ± 0.10 vs. 4.54 ± 0.12 mg/g BW, $p = 0.5915$) に有意差を認めなかった。NL 群(閉塞腎: 4.94 ± 0.30 mg/g BW, 非閉塞腎: 4.45 ± 0.16 mg/g BW)とニコランジル群とを比較すると、統計学的有意差を認めなかったが(閉塞腎: $p = 0.0561$, 非閉塞腎: $p = 0.9292$)、閉塞腎においては NL 群において腎重量が低くなる傾向が認められた (図 2)。

（２）腎間質の線維化（Masson's trichrome 染色）

腎間質の線維化の評価のため、Masson's trichrome 染色標本を作製し、青く染色された膠原線維の部分を point counting 法を用いて評価した（図 3）。コントロール群において、閉塞腎では非閉塞腎と比較して有意に高度の線維化を認めた（ 59.9 ± 3.21 vs. $0.90 \pm 0.19\%$, $p < 0.0001$ ）。閉塞腎において、ニコランジル群ではコントロール群と比較し、線維化を認める範囲が有意に軽度であった（ 36.3 ± 3.2 vs. $59.9 \pm 0.2\%$, $p = 0.0011$ ）。非特異的 NOS 阻害薬である L-NAME を投与した NL 群では、ニコランジル群と比較し有意に高度であった（ $63.1 \pm 3.0\%$, $p = 0.0004$ 、対ニコランジル群）。非閉塞腎においては、ニコランジル群ではコントロール群と比較し線維化の程度に有意な差を認めず（ 1.11 ± 0.30 vs. $0.90 \pm 0.19\%$, $p = 0.9013$ ）、NL 群との比較においても有意差を認めなかった（ $1.74 \pm 0.40\%$, $p = 0.3488$ 、対ニコランジル群）。

（３）FSP-1 染色（線維芽細胞の評価）

間質線維化の一つの指標である線維芽細胞の評価を目的として FSP-1 染色を施行した。400 倍の強拡大（hpf）視野あたりの FSP-1 陽性細胞（線維芽細胞）の数を測定した（図 4）。コントロール群において、閉塞腎では非閉塞腎と比較して有意に FSP-1 陽性細胞数の高値を認めた（ 98.6 ± 9.30 vs. 8.81 ± 1.28 cells/hpf, $p < 0.0001$ ）。閉塞腎において、ニコランジル群ではコントロール群と比較し、FSP-1 陽性細胞の有意な低値を認めた（ 67.0 ± 5.3 vs. 98.6 ± 9.3 cells/hpf, $p = 0.0093$ ）。NL 群（ 83.9 ± 3.8 cells/hpf）ではニコランジル群と比較して FSP-1 陽性細胞数は有意に高値であった（ $p = 0.0367$ 、対ニコラ

ンジル群)。非閉塞腎においては、ニコランジル群ではコントロール群と比較し FSP-1 陽性細胞数の有意な低値を認めず (11.5 ± 1.62 vs. 8.81 ± 1.28 cells/hpf, $p = 0.2648$)、NL 群との比較においても有意差を認めなかった (16.8 ± 1.92 cells/hpf, $p = 0.1002$ 、対ニコランジル群)。

(4) Single strand DNA 染色 (尿細管アポトーシスの評価)

アポトーシス細胞を特異的に染色する ssDNA 染色を行い、尿細管アポトーシスを評価した。コントロール群において、閉塞腎 (217.6 ± 13.6 nuclei/hpf) では非閉塞腎 (33.9 ± 7.80 nuclei/hpf) と比較して有意に ssDNA 陽性細胞数の高値を認めた ($p < 0.0001$)。閉塞腎において、ニコランジル群 (26.5 ± 3.0 nuclei/hpf) ではコントロール群 (217.7 ± 7.8 nuclei/hpf) と比較し尿細管アポトーシスは有意に低値であった ($p = 0.0003$) (図 5)。NL 群 (67.3 ± 9.0 nuclei/hpf) においてはニコランジル群と比較し、ssDNA 陽性尿細管細胞は有意に高値であった ($p = 0.0004$)。非閉塞腎においても、コントロール群においては ssDNA 陽性尿細管細胞が多数認められた (33.9 ± 7.80 cells/hpf) が、ニコランジル群 (0.40 ± 0.23 cells/hpf) ではコントロール群と比較し ssDNA 陽性細胞数の有意な低値を認め ($p = 0.0004$)、NL 群では有意に高値であった (5.14 ± 2.14 cells/hpf, $p = 0.0011$ 、対ニコランジル群)。

(5) CD68 染色 (マクロファージ浸潤の評価)

マクロファージを特異的に染色する CD68 染色で評価した。コントロール群において、閉塞腎では非閉塞腎と比較して有意に CD68 陽性細胞数の高値を認めた ($56.7 \pm$

5.29 vs. 2.34 \pm 0.41 cells/hpf, $p < 0.0001$)。閉塞腎において、ニコランジル群ではコントロール群と比較し CD68 陽性細胞数が有意に低値であった (28.6 \pm 4.12 vs. 56.7 \pm 0.41 cells/hpf, $p = 0.0026$) (図 6)。NL 群ではニコランジル群と比較し有意に高値であった (67.49 \pm 3.38 cells/hpf, $p = 0.0006$ 、対ニコランジル群)。非閉塞腎においても、ニコランジル群ではコントロール群と比較し CD68 陽性細胞数の有意な低値を認め (0.91 \pm 0.40 vs. 2.34 \pm 0.41 cells/hpf, $p = 0.0229$)、NL 群では有意に高値であった (2.41 \pm 0.29 cells/hpf, $p = 0.0205$ 、対ニコランジル群)。

(6) ニコランジルの NO 合成酵素発現への影響

閉塞腎において、NO 合成酵素である NOS 2 (induced NOS; iNOS) 及び NOS 3 (endothelial NOS; eNOS) 染色の発現を、コントロール群、ニコランジル群および NL 群について免疫組織染色で評価した。iNOS の免疫染色では、両群の片側腎の組織中に iNOS の発現が高くなる細胞は認められなかった。eNOS の免疫染色では、ニコランジル群および NL 群において、閉塞腎の血管内皮細胞が強く染色された (図 7)。一方、コントロール群においてはその傾向は認められなかった。またニコランジル群においては、非閉塞腎の血管内皮細胞においても強く染色される所見が認められた。この所見は、ニコランジル投与による腎 NO の産生増加に血管内皮細胞の eNOS 発現の上昇が関与していることを示唆する所見であると考えられた。また、L-NAME 投与において eNOS の発現は抑制されなかった。

第4節 考察

本章では、UUO においてニコランジルを投与した時の、腎重量、間質の線維化、尿管アポトーシス、そして炎症細胞浸潤に与える影響について検討した。さらにニコランジルの作用における NO 産生の関連性を確認するために NOS 阻害薬である L-NAME の投与を行う群も作成した。過去の報告においてニコランジルの NO donor としての作用は、血管内皮細胞における eNOS の発現上昇によるものとされている(27)。L-NAME には NOS 全般を非特異的に抑制する作用があり、ニコランジルの効果が L-NAME により抑制されれば、ニコランジルの効果の中の一部はニコランジルにより発現が増加する NOS の効果によることを間接的に証明できる。

腎臓の重量は NL 群においてニコランジル群と比較して低くなる傾向が認められた。腎重量の解釈は困難であるが、L-NAME による腎 NO の産生の抑制により腎障害が進み、ネフロンの減少から腎実質の菲薄化が進んだ可能性があると考えている。

腎間質の線維化に関して Masson's trichrome 染色および FSP-1 染色で評価を行った。コントロール群においては閉塞腎において有意に腎線維化が進み、FSP-1 陽性細胞数も増加した。閉塞腎における腎線維化の進行は過去の報告と一致し、腎間質線維化モデルとして UUO モデルが機能していることが確認された。ニコランジルの投与により Masson's trichrome 染色により評価した腎線維化は有意に抑制され、線維芽細胞数も有意に低下が認められた。この結果により、ニコランジルに腎間質線維化を抑制する効果があることが証明された。この腎線維化の抑制効果は NOS 阻害薬である L-NAME により相殺された。この結果から、ニコランジルの腎線維化抑制効果には、ニコランジルによる腎 NO 産生効果が影響している可能性が示された。過去の報告では NO donor が腎

線維化を抑制することが報告されており(16, 34)、今回の実験結果も過去の報告と矛盾しない結果となった。

尿細管アポトーシスに関しても、コントロール群においては閉塞腎において非閉塞腎と比較し著明に尿細管細胞にアポトーシスを認めた。この結果も、閉塞性腎症モデルとして、有効に機能していることが確認された。尿細管アポトーシスに関してもニコランジルの投与により、閉塞腎の尿細管アポトーシスが有意に抑制されることが確認された。この効果は L-NAME の投与により弱められ、ニコランジルの抗アポトーシス効果の一部はニコランジルによる NO 産生効果によるものと考えられた。しかしコントロール群においては NL 群と比較すると有意にアポトーシスをきたした尿細管細胞が多いことから、ニコランジルの抗アポトーシス作用には NO 産生以外の要因があることが示唆された。また、閉塞のない対側腎においても、ニコランジル群において有意に ssDNA 陽性細胞が減少していることも確認された。過去の報告においても UUO モデルにおいては対側腎においても尿細管細胞のアポトーシスが増加すると報告されている(16)。ニコランジルは対側腎の尿細管アポトーシスも抑制していた。

CD68 染色によるマクロファージ浸潤についても、コントロール群において閉塞腎において非閉塞腎と比較してマクロファージ浸潤の上昇を認めた。この所見も過去の報告と一致するところである。ニコランジルによりマクロファージ浸潤数は有意に減少し、ニコランジルにマクロファージ浸潤を抑制する効果があることが確認された。この効果は L-NAME の投与により腎 NO の産生を抑制することで相殺された。ニコランジルのマクロファージ浸潤抑制効果に、ニコランジルによる NO 産生効果が大きく影響していることが示された。

また、今回は腎における NOS の発現についても検討を行った。ニコランジルは *in vitro* の実験系において血管内皮細胞の細胞株 (Human umbilical vein endothelial cells; HUVECs) において eNOS の発現を高めることが報告されている(27)。またラットの血管内皮障害モデルにおいて、ニコランジルの投与により血管内皮細胞での eNOS の発現が上昇する事が報告されている(35)。これらの過去の研究から、ニコランジルの生体内の NO 産生の上昇に、血管内皮細胞における eNOS 発現の上昇が関与することが示されている。本章の結果では、UUO 作成後の腎臓において 2 週間後の血管内皮細胞における eNOS の発現がコントロール群と比較してニコランジル群で強く染色されたが、iNOS 染色においては強く染色される構造物は認めなかった。このことから、閉塞腎においてもニコランジル投与により eNOS 発現は上昇し、それに伴う NO 産生の上昇が bystander effect として周囲の腎組織に作用して腎保護作用を発揮するものと推察される。また、L-NAME を併用投与した NL 群において eNOS の発現は抑制されなかったことから、L-NAME は NOS の発現は抑制せず、NOS の機能を抑制するために NO 産生を抑制しているものと推察された。ただし、今回の eNOS の発現の検討は、免疫染色による検討であり定量的な評価はなされていないため、確定的な結論を導くことはできず今後の検討課題と考えている。

第 5 節 小括

尿管の閉塞により、腎組織には間質の線維化、尿細管アポトーシス、マクロファージ浸潤などの病理学的変化が引き起こされたが、ニコランジルの投与によりこれらの所見

は改善を認めた。そしてこれらのニコランジルによる腎障害改善効果は L-NAME の投与により抑制されることから、ニコランジルによる NO 産生作用がこれらの腎障害改善効果に関与しているものと思われた。しかし、尿細管アポトーシスに関してはニコランジルの投与により著明な改善を認めたが、L-NAME の投与による抑制効果は部分的なものだった。それゆえ、ニコランジルの尿細管アポトーシス改善効果には、ニコランジルにより増加した腎 NO による効果だけでなく、ニコランジルによる他の作用が影響を与えているものと予想された。さらに、2 週間閉塞腎においてニコランジルにより eNOS の発現上昇が認められた。ニコランジル投与による NO 産生の起源は、血管内皮細胞において発現が上昇した eNOS である可能性が示された。

第4章 ニコランジルの TGF- β に対する影響

第1節 背景

ニコランジルには、第2章で示した NO donor としての役割の他、線維化などの臓器障害を惹起するメディエーターである transforming growth factor- β (TGF- β)の抑制を介した臓器保護作用が報告されている(24, 36)。UUO モデルにおいても TGF- β は腎間質の線維化や尿細管アポトーシスをきたす重要なメディエーターであることが報告されている(2)。このため、腎組織における TGF- β 産生の抑制やその機能の抑制をターゲットとした治療法は、UUO モデルにおける腎障害を改善する事が報告されている(6, 37)。本章では、UUO モデルにおいてニコランジルが腎臓の TGF- β 1 産生に与える影響について検討した。

第2節 対象および方法

(1) 薬剤

ニコランジルは、シグマアルドリッチジャパン合同会社（東京都品川区）から購入した。Dimethyl Sulfoxide (DMSO)は富士フィルム和光純薬株式会社（大阪府大阪市）から購入した。ニコランジルは DMSO に溶解し、10 mg/ml とした。-20℃で保管し、使用時には 0.9%生理食塩水で希釈し 5mg/ml とした。TGF- β 1 測定キットである Quantikine TNF- α ELISA Kit を R & D Systems (Minneapolis, MN, USA)から購入した。

（２）ラットの閉塞性腎症（UUO）モデル

ラットの閉塞性腎症（UUO）モデルの作成に関しては第３章において記載している。

（３）UUO モデルにおける薬物の投与および腎採取

ラット UUO モデルにおける薬物の投与および腎採取に関しては第３章において記載している。

（４）腎組織中 TGF- β 1 の ELISA 法による測定

腎組織中の TGF- β 1 を ELISA 法により測定した。凍結した腎組織の皮質約 30 mg を 400 μ l の脱イオン水で入念にボモジェネートし、1 時間室温で放置した。それぞれの組織は正確に重量を測定し記載した。80 μ l の 1N 塩酸を加え、30 分室温で放置した。80 μ l の 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES を加え攪拌した後に 12,000 rpm, 20 分で遠心分離し、上清を分析に用いた。

特異的 TGF- β 1 モノクローナル抗体がコーティングされている付属の 96 ウェルプレート
トの各ウェルにバッファー溶液 RD1-73 を 50 μ l 加え、各検体、コントロール溶液、TGF- β 1 スタンダード液を 50 μ l ずつ加えた。室温で 2 時間放置した。ウェル内の液を除去し、付属の洗浄バッファーで 4 回洗った後、TGF- β 1 conjugate （抗 TGF- β 1 ポリクローナル抗体）100 μ l を加え、室温で 2 時間放置した。液を除去し、付属の洗浄バッファーで 4 回洗浄し、100 μ l の substrate solution （標識酵素）を加え、遮光下で 30 分室温で放置した。Stop solution を 100 μ l 加え反応を停止し、マイクロプレートリーダー（和光純薬工業株式会社）で 450 nm で吸光度を測定した。

（５）統計学的解析

平均値の誤差には標準誤差を用いた。２群間の比較は、Mann-Whitney *U* test で検定した。検定には JMP14（SAS Institute Japan 株式会社、東京都港区）を使用した。 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意とした。

第３節 結果

閉塞腎および対側腎の凍結組織を用い、UUO における腎障害の重要なメディエーターである TGF- β 1 を ELISA 法によって測定した。コントロール群においては非閉塞腎 (0.30 ± 0.05 pg/mg tissue) と比較して閉塞腎 (11.3 ± 1.62 pg/mg tissue) において著明に組織中 TGF- β 1 量の高値を認めた ($p < 0.0001$)。次に閉塞腎においてニコランジル群とコントロール群を比較した。コントロール群 (11.3 ± 1.62 pg/mg tissue) と比較し、ニコランジル群 (6.31 ± 1.79 pg/mg tissue) においては腎組織中の TGF- β 1 量は統計学的に有意に低値を認めた ($p = 0.0232$) (図 8)。非閉塞腎においては、ニコランジル群 (0.21 ± 0.05 pg/mg tissue) はコントロール群 (0.30 ± 0.05 pg/mg tissue) と比較し、TGF- β 1 量の統計学的な有意差は認めなかった ($p = 0.1998$)。

第４節 考察

TGF- β 1 タンパクは、様々な作用を有するサイトカインであり、細胞外マトリクス、創傷治癒、免疫機能、細胞増殖、細胞分化を調整している。TGF- β 1 は様々な組織の線維化

を引き起こすことが報告されている。例えば、糸球体腎炎モデルにおいては抗 TGF- β 1 抗体が間質の線維化を軽減する事が知られている(24)。UUO においては、TGF- β 1 が閉塞腎の間質線維化や尿細管アポトーシスに関与する重要なメディエーターであることが報告されている(6)。TGF- β 1 をターゲットとした治療を行うことにより UUO モデルにおける腎障害を改善する事も過去の報告で確認されている(6, 12, 13, 37)。TGF- β のモノクローナル抗体である 1D11 は UUO モデルにおける間質線維化、尿細管アポトーシスを抑制することが報告されている(6)。また、抗アレルギー剤であるトラニラストやオウゴンより抽出されたフラボノイド配糖体であるバイカリンなどは、腎組織内の TGF- β 1 濃度を低下させ、動物の UUO モデルにおいて腎障害を抑制することが示されている(13, 37)。また、HMG-CoA 阻害薬であるアトルバスタチンは、ラット UUO モデルにおける TGF- β 濃度を減少させ、尿細管障害や腎間質の線維化を抑制する事が報告されている(12)。

ニコランジルに関しては、ラット糸球体腎炎モデルにおいて、ニコランジルの投与が TGF- β 1 の発現を抑制し、タンパク尿、メサングウム細胞の増殖、腎の萎縮を抑制したと報告されている(24)。今回の実験においても、ニコランジルの投与により腎組織中の TGF- β 1 濃度は低下していた。

第5節 小括

閉塞性腎症モデルにおいて、閉塞腎においては対側腎に比較して有意に腎組織 TGF- β 1 濃度の上昇を認めた。ニコランジル投与群ではコントロール群と比較し、閉塞腎組織の TGF- β 1 濃度の有意な低下を認めた。

第5章 ニコランジルの抗酸化作用に与える影響

第1節 背景

UUO では酸化ストレスとの関連が報告されている。UUO 後の腎組織では、スーパーオキシドアニオンおよび過酸化水素が増加し、それに応じカタラーゼや銅/亜鉛スーパーオキシドディスムターゼが減少する事(38)や、UUO では酸化ストレスマーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)や heme oxygenase-1 (HO-1)が上昇する事(9, 39)が報告されている。Pat らは、ラット UUO モデルにおいて、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG や HO-1 の上昇とともに腎線維化、尿細管アポトーシスが進行し、尿細管において細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) の発現上昇が認められる事を報告した(39)。さらに Mizuguchi らは、ラット UUO モデルにおいて抗酸化タンパクである SS-31 が、8-OHdG や HO-1 などの酸化ストレスマーカーを抑制し、腎障害（間質線維化、尿細管アポトーシス、炎症細胞浸潤など）を抑制する事を報告した(10)。これらの過去の実験結果から、抗酸化作用を有する薬剤は UUO における腎障害を抑制する可能性がある。

ニコランジルには、第2章で示した NO donor としての役割、第3章で示した TGF- β 産生抑制作用のほか、酸化ストレス抑制作用による臓器保護効果が報告されている(22, 25)。本章では、ニコランジルが UUO において酸化ストレスを抑制する効果があるか否かについて検討した。

第2節 対象および方法

(1) 薬剤

ニコランジルは、シグマアルドリッチジャパン合同会社から購入した。抗 Heme Oxygenase- 1 (HO-1)抗体は、Enzo Life Sciences, Inc (Farmingdale, NY, USA)から購入した。抗ジチロシンモノクローナル抗体は、日研ザイル株式会社日本老化制御研究所（静岡県袋井市）から購入した。ニコランジルは DMSO に溶解し、10 mg/ml とした。－20℃で保管し、使用時には 0.9%生理食塩水で希釈し 5mg/ml とした。

(2) ラット UUO モデル

ラットの閉塞性腎症（UUO）モデルの作成に関しては第3章において記載している。

(3) UUO モデルにおける薬物の投与および腎採取

ラット UUO モデルにおける薬物の投与および腎採取に関しては第3章において記載している。

(4) 免疫組織染色および評価方法

腎組織のパラフィン包埋ブロックを厚さ 4μm で薄切し、パラフィン包埋切片を作製した。切片が固定されたプレパラートをキシレン及びエタノール（100%のキシレン 5分×3回、100%エタノール 5分×2回、80%エタノール 5分×1回）で処理しパラフィ

ンを除去した。5%塩酸 95%エタノールで室温で 5 分間処理し、内因性アルカリフォスファターゼの失活化を行った。流水で 10 分間洗浄後、脱イオン水に通した。抗原賦活化は、10mM クエン酸バッファー pH 6.0 に浸け、オートクレーブで 121℃で 10 分間処理した。室温で 20 分以上自然冷却し、流水で 10 分間洗浄し、脱イオン水を通した。次に、ブロックエース 0.4%リン酸バッファー溶液 pH 7.4 で 10 分間ブロッキングを施行した。抗 8-OHdG 抗体（日研ザイル株式会社日本老化制御研究所）（1 対 100 に PBS で希釈）100μl をプレパラートに加え、湿潤下に 4℃で一晩放置した。PBS で洗浄後、2 次抗体は Envision Labelled Polymer-AP Mouse/Rabbit（Dako）を用い、30 分間室温で放置した。PBS で洗浄後、Black Alkaline Phosphatase Substrate (SK-5200)（Vector）で 20 分発色させた。流水で 5 分間洗浄し、脱イオン水を通した後、エタノール及びキシレンで脱水（80%エタノール 5 分間×1 回、100%エタノール 5 分間×2 回、100%キシレン 5 分間×3 回）し、封入した。400 倍視野で陽性細胞数をカウントした。1 検体につき 10 視野でカウントし、平均を求めた。

（5）ウエスタンブロット

抗酸化マーカーである Heme Oxygenase (HO-1)及びジチロシンの発現について、ウエスタンブロット法を用いて評価した。腎凍結検体 50 mg に対して、radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 50 mM NaF, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄) 200 μl を加え、氷上で腎組織を破碎し、4℃で 1 時間放置した。4℃, 12,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清のタンパクを抽出した。それぞれのタンパク濃度を Lowry

法で測定した後、同量のタンパク及びスタンダード(Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA)を 10% polyacrylamide gel (Mini-PROTEAN TGX Gels, Bio-Rad Laboratory)にのせ、Power Pac Basic (Bio-Rad Laboratory)で 120V で電気泳動し、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA) に転写した。次いで、TBS-T(脱イオン水 1000ml、1 mol Tris-HCl Buffer Solution 10ml、Sodium Chloride 9g、TWEEN 20 1ml)を作成し、5%スキムミルクを含む TBS-T で非特異的な抗体の結合に対するブロッキングを 2 時間室温で行った後、1 次抗体を加え、4°C で一晩反応させた。2 次抗体は、それぞれの 1 次抗体に応じて、horseradish-tagged secondary antibodies (Rabbit IgG, 1:5000, Bio-Rad)もしくは horseradish-tagged secondary antibodies (Mouse IgG, 1:5000, Bio-Rad)を使用し、室温で 60 分間反応させた。その後に TBS-T でニトロセルロース膜を 10 分間、3 回洗浄し、ECL Plus system (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA)を用いてフィルムに現像した。

抗 HO-1 抗体は TBS-T で 1 μ g/ml に希釈した。2 次抗体は rabbit IgG を使用した。抗ジチロシン抗体は、蒸留水で溶解し 100 μ g/ml とし、-20°Cで保存した。使用時には TBS-T で 1 μ g/ml に希釈した。2 次抗体は Mouse IgG を使用した。

(6) 統計学的解析

平均値の誤差には標準誤差を用いた。2 群間の比較は、Mann-Whitney *U* test で検定した。検定には JMP14 (SAS Institute Japan 株式会社、東京都港区)を使用した。 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意とした。

第3節 結果

(1) 8-OHdG 染色 (核の酸化ストレスマーカー)

DNA の酸化ストレスマーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)染色で評価した。コントロール群において、閉塞腎 (348.1 ± 32.1 nuclei/hpf) は非閉塞腎 (88.2 ± 13.6 nuclei/hpf) と比較して有意に 8-OHdG 陽性細胞数の高値を認めた ($p < 0.0001$)。閉塞腎において、ニコランジル群 (11.6 ± 3.8 nuclei/hpf) はコントロール群 (348.1 ± 32.1 nuclei/hpf) と比較し、8-OHdG 陽性細胞数の有意な低値を認めた ($p = 0.0003$)。非閉塞腎においても 8-OHdG 陽性細胞を認めたが、ニコランジル群 (4.1 ± 3.2 nuclei/hpf) はコントロール群 (88.2 ± 13.6 nuclei/hpf) と比較し、8-OHdG 陽性細胞数の有意な低値を認めた ($p = 0.0004$) (図 9)。

(2) ウェスタンブロット

UUO においてニコランジルを投与した時の酸化ストレスを、抗 HO-1 抗体及び抗ジチロシン抗体で評価した。コントロール群において、閉塞腎は非閉塞腎と比較し、HO-1 及びジチロシンが強く発現した。閉塞腎においてニコランジル投与群はコントロール群と比較し、HO-1 及びジチロシンが弱く発現した (図 10)。

第4節 考察

ニコランジルには様々な抗酸化作用を有することが報告されている。ラット糖尿病モデルの血管内皮において、ニコランジルが NADPH oxidase の発現を抑制したという報

告(35)や、ラット虚血再灌流障害モデルの尿細管細胞において、ニコランジルが脂質酸化損傷マーカーである 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)の発現を抑制したという報告(25)がある。また、ラット UUO モデルにおいて、抗酸化ペプチドである SS-31 が、閉塞腎における間質の線維化や尿細管アポトーシス、マクロファージの浸潤を改善したという報告がある(10)。このように抗酸化作用を有する薬剤は UUO による腎障害を改善する可能性がある。今回は抗酸化酵素である Heme oxygenase (HO)-1 およびタンパク質の酸化マーカーであるジチロシンの発現をウエスタンブロット法で検討するとともに、DNA の酸化の指標である 8OH-dG の発現を組織標本の免疫染色で評価した。

今回はウエスタンブロットにおいて、ニコランジル投与により閉塞腎における抗酸化酵素である heme oxydase (HO)-1 の発現の低下を認めた。Heme oxydase は、酸化ストレスにより誘導されるタンパク質であり(40)、HO-1 は、ヘムをビリベルジンと一酸化炭素と遊離鉄に分解する酵素であり、これにより産生されるビリベルジンには抗酸化作用がある。HO-1 の発現上昇は酸化ストレスが亢進していることを反映しており、HO-1 が退化すれば酸化ストレスが軽減したと解釈できる。また、DNA の酸化損傷マーカーである 8-OHdG やタンパク質の酸化損傷により形成されるジチロシンの発現の低下を認めた。8-OHdG は、DNA 中のグアニン塩基が活性酸素の作用により酸化損傷を受けて生成されたものである。またジチロシンは、タンパク質中のチロシン残基が酸化ストレスにより架橋構造を形成したチロシン 2 量体である。8-OHdG 染色及び HO-1 およびジチロシンのウエスタンブロットの結果から、ニコランジルは閉塞腎で亢進した酸化ストレスを減じていることが示された。

第5節 小括

閉塞性腎症におけるニコランジルの投与は、閉塞腎において発現が亢進した酸化ストレスマーカーである HO-1 及びジチロシンの発現を低下させた。また、核酸の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG については閉塞腎のみならず非閉塞腎においても発現を低下させた。

第6章 統括的考察

本研究では、閉塞性腎症に対するニコランジルの効果に関する検討を行った。第2章では、予備的実験として、尿管閉塞を伴わないラットにおいて、ニコランジルの投与は腎 NO の産生を増加させることを確認した。第3章では、閉塞腎における腎の線維化、尿細管アポトーシス、炎症細胞浸潤がニコランジル投与により改善される事が確認された。この腎障害改善効果は L-NAME の投与で減弱することから、これらの組織学的改善の機序としてニコランジルによる腎 NO 産生が一部寄与しているものと考えられた。さらに2週間の UUO モデルにおいてニコランジル投与により血管内皮細胞の eNOS の発現が増加していることが示唆された。しかし尿細管アポトーシスのように NO 産生による効果のみでは説明できない所見もあり、ニコランジルには腎障害を改善する他の機序の作用があるものと考えられた。第4章では、ニコランジル投与により閉塞腎における腎障害進行の重要なメディエーターである TGF- β 1 の産生が低下する事を示すことができた。それゆえニコランジルの TGF- β 1 産生を抑制する作用も腎障害を抑制する効果に寄与しているものと推察された。そして第5章では、ニコランジルの投与により閉塞腎において酸化ストレスマーカーの発現低下を認め、ニコランジルの抗酸化作用も腎障害抑制に寄与する可能性があると考えられた。

閉塞性腎症は、尿管結石の嵌頓、婦人科や外科系悪性腫瘍による外部からの尿管閉塞、後腹膜線維症などの様々な病態で発生し、泌尿器科診療においては日常的に遭遇する罹患頻度の高い病態である。尿管閉塞が持続すると間質の線維化、尿細管アポトーシス、炎症細胞浸潤などをきたし腎障害が進行していく。適切な治療がなされなければ最

最終的には腎機能は廃絶する。臨床的には尿管閉塞がある場合、尿管ステントや腎瘻などで閉塞を解除する事が治療の第一選択である。このような早期の閉塞解除が腎障害の進行を抑制する主な治療法となるが、閉塞解除後もしばらくの間は腎障害が進行することが動物モデルでは示唆されている。Ito らは、3 日間の閉塞性腎症の解除モデルにおいて、閉塞解除後 1 ヶ月において、糸球体ろ過量 (GFR) や腎血漿流量 (RPF) は回復しているが、組織学的には腎線維化は進行し、尿細管アポトーシスは遷延していることを報告している(3)。このため、閉塞が持続しているときのみでなく、解除された後も腎障害を抑制する治療の必要性が示唆されている。早期の閉塞解除と早期の薬物による治療介入が最終的に温存できる腎機能を高くするものと思われ、臨床的にも非常に重要な問題と考えられる。

今回 UUO の治療薬としてニコランジルを選択した理由について述べる。ニコランジルは、循環器領域ですでに臨床的に用いられている薬剤であり、人体に投与する薬剤として安全性が確認されており、その使用についても臨床医に十分な経験がある。このため閉塞性腎症の治療にも安全に投与することができ、臨床応用しやすいと考えられる。ニコランジルには K channel opener として血管平滑筋を弛緩させることによる血管拡張作用だけでなく、臓器の NO 産生を高める作用、TGF- β 1 産生を抑制する作用、抗酸化作用などを有する事が他の動物実験モデルで証明されている(22, 23, 27, 35, 36)。さらに、腎疾患の動物モデルにおいて、NO 産生を高める作用(31)、TGF- β 1 産生を抑制する作用(24)、抗酸化作用(25)が報告されている。閉塞性腎症の動物モデルでは、NO donor(15, 16)、TGF- β の機能や産生の抑制(6, 12, 37)、抗酸化薬(10, 41)が効果を認めるこ

とが証明されている。閉塞性腎症に対してニコランジルが投与された報告はまだないが、ニコランジルはこれらの3つの作用を閉塞性腎症においても発揮する可能性があり、閉塞性腎症の治療薬として有望であると考えた。

まず予備実験（第2章）として、閉塞を伴わないラットにニコランジルを投与し、尿中 NO が増加することを確認した。ラット閉塞性腎症モデルの実験では、閉塞腎作成前に2日間ニコランジルを投与しているため、尿管結紮時には腎臓における NO の産生が高まっていると考えられる。さらに2週間の尿管閉塞後に採取した腎臓において血管内皮細胞の eNOS の発現上昇が確認されており、閉塞腎においてニコランジルの投与により eNOS の発現上昇が起こり、腎 NO 産生が増加しているものと推察される。また非閉塞腎においても、ニコランジルの投与により血管内皮細胞における eNOS の発現上昇を認め、ニコランジルによる血管内皮細胞の eNOS 発現の誘導を支持する所見と思われた。一方、iNOS の免疫染色では、ニコランジル投与による尿細管細胞、間質細胞、血管構成細胞において明らかな発現の変化は認めなかった。

今回は UUO モデルにおいては非特異的 NOS 阻害薬である L-NAME の投与を行い、正常腎およびニコランジル投与による NO 産生を抑制するグループを作成した。NO の産生を抑制したところ、ニコランジルの抗線維化効果、抗尿細管アポトーシス効果、抗炎症性細胞浸潤効果はすべて有意に減弱した。このため、ニコランジルによるこれらの腎障害抑制効果の機序の1つとして腎 NO 産生による効果があることが示唆された。特に抗線維化効果や抗炎症性細胞浸潤効果に関しては、L-NAME により相殺されるような結果となっており、ニコランジルの効果における NO の作用は意外に

も大きいかもしれない。一方、抗尿細管アポトーシス効果に関しては NO の作用はあるものの十分な作用ではないのかもしれない。特に抗アポトーシス効果に関しては TGF- β 1 産生の抑制作用や抗酸化作用などが効果を発揮しているのかもしれない。ニコランジルは他の動物実験においても NO の産生が高まることが報告されている。ラットにおいてニコランジルを投与した場合、肺・心臓・肝臓の組織 NO の増加を Griess 法で測定した報告がある(42)。また、ラット高血圧モデルにおけるニコランジル投与により、降圧を介さずに尿中の NO が上昇した (Griess 法で測定) 事が報告されている(31)。その報告では、腎皮質における eNOS の発現上昇を認めており、eNOS が NO 産生の起源であることが示唆されている。ニコランジル投与により腎組織の eNOS が上昇する事は、別のラット高血圧モデルにおいても報告されている(31, 32)。また *in vitro* の実験系においてはヒト臍帯静脈内皮細胞株 (human umbilical vein endothelial cells; HUVECs) において、ニコランジルの投与により eNOS の発現が上昇することが証明されている(27)。NO donor は過去の実験において、UUO の腎障害を抑制する作用があることが証明されている(16, 34)。NO が腎障害を抑制する機序として、NO が反応性システイン残基の S-ニトロシル化を引き起こし、カスパーゼ活性を抑制し、尿細管アポトーシスを抑制する事が報告されている(43)。また、線維芽細胞のアポトーシスを誘導し間質の線維化を抑制する可能性(16)、マクロファージのアポトーシスを誘導することにより炎症細胞浸潤を抑制する可能性(44)が報告されている。

ニコランジルの投与により腎組織の TGF- β 1 の濃度の低下を認めた。TGF- β 1 は閉塞性腎症の腎障害の進行の重要なメディエーターである。TGF- β 1 は尿細管圧の上昇により放出され、p53 の発現を誘導し、腎線維化、尿細管アポトーシスなどを誘導する重要な物質である(6)。TGF- β 1 を低下させる治療法として、抗 TGF- β 1 抗体である 1D11(6) の投与や、トラニラスト(37)、COX2 阻害薬(14)などが試みられ動物レベルでは効果を認めている。ニコランジルに関しては、ラット糸球体腎炎モデルにおいて、ニコランジルの投与が TGF- β 1 の発現を抑制し、タンパク尿、メサングウム細胞の増殖、腎の萎縮を抑制したと報告されている(24)。今回の実験においてもニコランジルの投与により有意に腎組織中の TGF- β 1 は低下していた。ニコランジルの抗線維化効果、抗アポトーシス効果、抗炎症性細胞浸潤効果に TGF- β 1 の産生抑制作用が関与している可能性がある。特に抗アポトーシス効果に関してはニコランジルによる NO 産生増加作用だけでは説明できず、この TGF- β 1 産生抑制効果が関与している可能性がある。過去の報告では、ラット UUO モデルにおいて、抗 TGF- β 1 抗体が閉塞腎の尿細管アポトーシスを著明に抑制することが示されている(6)。

ニコランジルにはさまざまな抗酸化作用を有することが報告されている。例えば、ヒト冠動脈内皮細胞株 (human coronary artery endothelial cells; HCAECs) を用いた実験では、糖分過多ストレスにおいてニコランジルを投与することで抗酸化酵素である NADPH oxidase の産生を抑制する事が確認された(35)。また、ラットの腎動脈虚血再灌流モデルにおいて、ニコランジルの投与により脂質の酸化損傷マーカーである 4-HNE や DNA 酸化損傷マーカーである 8-OHdG の発現を抑制する事が報告されている

(25)。UUO モデルにおいては、様々な抗酸化物質の投与により閉塞腎の腎障害の改善効果を認める事が報告されている。例えば、抗酸化ペプチドである SS-31 の投与によりラット UUO モデルにおいて間質の線維化、尿細管アポトーシス、マクロファージの浸潤を軽減し、HO-1 や 8-OHdG の発現を抑制することが報告されている(10)。また、別の報告では、カルシトニン遺伝子関連ペプチドであるインテルメジンの投与により、HO-1 の活性化を介して UUO における間質の線維化を軽減することが証明されている(41)。今回はウェスタンブロットによる検討で、ニコランジルの投与により閉塞腎の HO-1 やタンパク質の酸化ストレスマーカーであるジチロシンの発現が低下することが証明された。また、核酸の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の免疫染色における検討において、ニコランジルにより閉塞腎の 8-OHdG 陽性細胞数の有意な減少を認めた。さらに非閉塞腎においても 8-OHdG 陽性細胞数の有意な減少を認めた。これらの一連の実験結果により、ニコランジルはラット UUO モデルにおいて腎臓に対する抗酸化作用を有することが証明された。

今回の実験の **limitation** を示す。第一の点として、今回の動物実験モデルにおける薬剤投与のタイミングと実際の臨床における治療開始可能時期との乖離である。今回のラット UUO モデルでは UUO 作成 2 日前から薬剤を投与しているが、実臨床では、尿管閉塞が発生した後に治療が開始される。本研究においてはニコランジル投与 2 日後に腎 NO 産生が増加しているという基礎実験（第 2 章）の結果を踏まえ、腎 NO 産生が増加することが確認されているタイミングで尿管閉塞を行った。薬剤の効果を確認する

ために過去の研究(15, 16, 34)において用いた手法である。今後動物実験で、UUO 作成後にニコランジル投与を行った場合の腎障害に対する効果について検証する必要がある。第二の点として、今回の動物実験におけるニコランジルの投与量と実臨床における投与量の乖離である。本研究においてはニコランジルを 5 mg/kg/day で投与したが、臨床での投与量は内服で 15 mg/day (50 kg の患者においては 0.3 mg/kg/day)、狭心症急性期でも 6 mg/hr (50 kg の患者では約 3mg/day) であり、本研究の投与量よりも少ない。本研究においてはニコランジルを用いた過去の動物実験(27)に使用された投与量を踏襲したが、今後は実臨床の投与量に近い量を用いた検証も必要であると考ええる。

第 7 章 結論

ニコランジルは閉塞性腎症の腎障害に関する重要なメディエーターである TGF- β 1 の産生抑制、NO の産生増加を介して、閉塞性腎症の腎障害の進行を抑制することが示唆された。さらに、ニコランジルには閉塞性腎症により起こる酸化ストレスを減じる作用もあり、この点においても閉塞性腎症による腎障害の進行に抑制的に働く可能性がある。TGF- β 1 産生抑制作用、腎 NO 産生作用、抗酸化作用という腎保護に働く 3 つの有力な作用を有することより、ニコランジルは閉塞性腎症の治療薬として理想的であり、すでに臨床応用されていることから有望な薬剤であると考えられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究において御指導、御高閲を賜りました、防衛医科大学校泌尿器科学講座教授 伊藤敬一先生、同講座前教授 浅野友彦先生、防衛医科大学校内科学講座教授 熊谷裕生先生、防衛医科大学校病態病理学講座教授 津田均先生に深甚なる感謝の意を表します。また終始懇切に多大なる御指導を賜りました防衛医科大学校泌尿器科学講座助教 浅野貴子先生、各種染色法についてご指導を賜りました、防衛医科大学校病態病理学講座 大沼千波先生に感謝の意を表しますとともに、多岐にわたってご助力頂きました防衛医科大学校泌尿器科学講座の皆さまに謝意を表します。

引用文献

1. Gobe GC, Axelsen RA. Genesis of renal tubular atrophy in experimental hydronephrosis in the rat. Role of apoptosis. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1987;56(3):273-81.
2. Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF-beta 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation. Kidney international. 1993;44(2):313-21.
3. Ito K, Chen J, El Chaar M, Stern JM, Seshan SV, Khodadadian JJ, et al. Renal damage progresses despite improvement of renal function after relief of unilateral ureteral obstruction in adult rats. American journal of physiology Renal physiology. 2004;287(6):F1283-93.
4. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. Kidney international. 1995;47(5):1285-94.
5. Miyajima A, Kosaka T, Kikuchi E, Oya M. Renin-angiotensin system blockade: Its contribution and controversy. International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association. 2015;22(8):721-30.
6. Miyajima A, Chen J, Lawrence C, Ledbetter S, Soslow RA, Stern J, et al. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. Kidney international. 2000;58(6):2301-13.
7. Schreiner GF, Harris KP, Purkerson ML, Klahr S. Immunological aspects of acute ureteral obstruction: immune cell infiltrate in the kidney. Kidney international. 1988;34(4):487-93.

8. Sakai T, Kawamura T, Shirasawa T. Mizoribine improves renal tubulointerstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction (UUO)-treated rat by inhibiting the infiltration of macrophages and the expression of alpha-smooth muscle actin. *The Journal of urology*. 1997;158(6):2316-22.
9. Kawada N, Moriyama T, Ando A, Fukunaga M, Miyata T, Kurokawa K, et al. Increased oxidative stress in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney international*. 1999;56(3):1004-13.
10. Mizuguchi Y, Chen J, Seshan SV, Poppas DP, Szeto HH, Felsen D. A novel cell-permeable antioxidant peptide decreases renal tubular apoptosis and damage in unilateral ureteral obstruction. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008;295(5):F1545-53.
11. Soliman SA, Shokeir AA, Mosbah A, Abol-Enein H, Barakat N, Abou-Bieh E, et al. Recoverability of renal function after relief of chronic partial unilateral ureteric obstruction: The effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor (enalapril). *Arab journal of urology*. 2011;9(1):67-71.
12. Mizuguchi Y, Miyajima A, Kosaka T, Asano T, Asano T, Hayakawa M. Atorvastatin ameliorates renal tissue damage in unilateral ureteral obstruction. *The Journal of urology*. 2004;172(6 Pt 1):2456-9.
13. Zheng L, Zhang C, Li L, Hu C, Hu M, Sidikejiang N, et al. Baicalin ameliorates renal fibrosis via inhibition of transforming growth factor beta1 production and downstream signal transduction. *Molecular medicine reports*. 2017;15(4):1702-12.
14. Miyajima A, Ito K, Asano T, Seta K, Ueda A, Hayakawa M. Does cyclooxygenase-2 inhibitor prevent renal tissue damage in unilateral ureteral obstruction? *The Journal of urology*. 2001;166(3):1124-9.

15. Ito K, Chen J, Vaughan ED, Jr., Seshan SV, Poppas DP, Felsen D. Dietary L-arginine supplementation improves the glomerular filtration rate and renal blood flow after 24 hours of unilateral ureteral obstruction in rats. *The Journal of urology*. 2004;171(2 Pt 1):926-30.
16. Ito K, Yoshii H, Asano T, Seta K, Mizuguchi Y, Yamanaka M, et al. Adrenomedullin increases renal nitric oxide production and ameliorates renal injury in mice with unilateral ureteral obstruction. *The Journal of urology*. 2010;183(4):1630-5.
17. 中江 一, 劉 全, 中川 弥, 他. イヌの心外膜冠動脈と冠抵抗血管トーン調節における ATP-sensitive Potassium Channel の関与. *Therapeutic Research*. 1993;14(3):775-85.
18. 松下 尚, 弘瀬 雅. 【ATP 感受性 K⁺チャネルを標的とした有用な疾患治療戦略の発展】 虚血誘発心臓不整脈と ATP 感受性 K⁺チャネル. *日本薬理学雑誌*. 2015;146(1):5-9.
19. 松本 鉄, 高橋 正, Liu Q, 他. 心外膜冠動脈におけるニコランジル, ニトログリセリン, 一酸化窒素作用の部位差. *Therapeutic Research*. 1996;17(4):1161-8.
20. Taira N. Nicorandil as a hybrid between nitrates and potassium channel activators. *The American journal of cardiology*. 1989;63(21):18j-24j.
21. Akao M, Teshima Y, Marban E. Antiapoptotic effect of nicorandil mediated by mitochondrial atp-sensitive potassium channels in cultured cardiac myocytes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(4):803-10.
22. Kasono K, Yasu T, Kakehashi A, Kinoshita N, Tamemoto H, Namai K, et al. Nicorandil improves diabetes and rat islet beta-cell damage induced by streptozotocin in vivo and in vitro. *European journal of endocrinology*. 2004;151(2):277-85.
23. Kamiyama Y, Muto S, Masuda H, Ide H, Ishizuka N, Saito K, et al. Inhibitory effects of nicorandil, a K ATP channel opener and a nitric oxide donor, on overactive bladder in animal models. *BJU international*. 2008;101(3):360-5.

24. Sudo H, Hirata M, Kanada H, Yorozu K, Tashiro Y, Serizawa K, et al. Nicorandil improves glomerular injury in rats with mesangioproliferative glomerulonephritis via inhibition of proproliferative and profibrotic growth factors. *Journal of pharmacological sciences*. 2009;111(1):53-9.
25. Shimizu S, Saito M, Kinoshita Y, Ohmasa F, Dimitriadis F, Shomori K, et al. Nicorandil ameliorates ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. *British journal of pharmacology*. 2011;163(2):272-82.
26. Asensio-Lopez MC, Soler F, Pascual-Figal D, Fernandez-Belda F, Lax A. Doxorubicin-induced oxidative stress: The protective effect of nicorandil on HL-1 cardiomyocytes. *PloS one*. 2017;12(2):e0172803.
27. Sahara M, Sata M, Morita T, Hirata Y, Nagai R. Nicorandil attenuates monocrotaline-induced vascular endothelial damage and pulmonary arterial hypertension. *PloS one*. 2012;7(3):e33367.
28. Mohamed YS, Ahmed LA, Salem HA, Agha AM. Role of nitric oxide and KATP channel in the protective effect mediated by nicorandil in bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Biochemical pharmacology*. 2018;151:135-42.
29. Ng HH, Leo CH, Parry LJ, Ritchie RH. Relaxin as a Therapeutic Target for the Cardiovascular Complications of Diabetes. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:501.
30. Group IS. Impact of nicorandil in angina: subgroup analyses. *Heart (British Cardiac Society)*. 2004;90(12):1427-30.
31. Serizawa K, Yogo K, Tashiro Y, Koike N, Aizawa K, Hirata M, et al. Nicorandil ameliorated hypertensive renal injury without lowering blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology*. 2013;91(1-2):92-103.

32. Tashiro Y, Yogo K, Serizawa K, Endo K. Nicorandil suppresses urinary protein excretion and activates eNOS in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Clinical and experimental nephrology*. 2015;19(3):343-9.
33. Ito K, Chen J, Khodadadian JJ, Seshan SV, Eaton C, Zhao X, et al. Liposome-mediated transfer of nitric oxide synthase gene improves renal function in ureteral obstruction in rats. *Kidney international*. 2004;66(4):1365-75.
34. Ito K, Chen J, Seshan SV, Khodadadian JJ, Gallagher R, El Chaar M, et al. Dietary arginine supplementation attenuates renal damage after relief of unilateral ureteral obstruction in rats. *Kidney international*. 2005;68(2):515-28.
35. Serizawa K, Yogo K, Aizawa K, Tashiro Y, Ishizuka N. Nicorandil prevents endothelial dysfunction due to antioxidative effects via normalisation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase in streptozotocin diabetic rats. *Cardiovascular diabetology*. 2011;10:105.
36. Saito M, Tsounapi P, Oikawa R, Shimizu S, Honda M, Sejima T, et al. Prostatic ischemia induces ventral prostatic hyperplasia in the SHR; possible mechanism of development of BPH. *Scientific reports*. 2014;4:3822.
37. Miyajima A, Asano T, Asano T, Yoshimura I, Seta K, Hayakawa M. Tranilast ameliorates renal tubular damage in unilateral ureteral obstruction. *The Journal of urology*. 2001;165(5):1714-8.
38. Ricardo SD, Ding G, Eufemio M, Diamond JR. Antioxidant expression in experimental hydronephrosis: role of mechanical stretch and growth factors. *The American journal of physiology*. 1997;272(6 Pt 2):F789-98.

39. Pat B, Yang T, Kong C, Watters D, Johnson DW, Gobe G. Activation of ERK in renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction: modulation by antioxidants. *Kidney international*. 2005;67(3):931-43.
40. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(1):99-103.
41. Qiao X, Wang L, Wang Y, Su X, Qiao Y, Fan Y, et al. Intermedin attenuates renal fibrosis by induction of heme oxygenase-1 in rats with unilateral ureteral obstruction. *BMC nephrology*. 2017;18(1):232.
42. Minamiyama Y, Takemura S, Hai S, Suehiro S, Okada S, Funae Y. Nicorandil elevates tissue cGMP levels in a nitric-oxide-independent manner. *Journal of pharmacological sciences*. 2007;103(1):33-9.
43. Haendeler J, Weiland U, Zeiher AM, Dimmeler S. Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric oxide : biology and chemistry*. 1997;1(4):282-93.
44. Taylor EL, Megson IL, Haslett C, Rossi AG. Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2003;10(4):418-30.

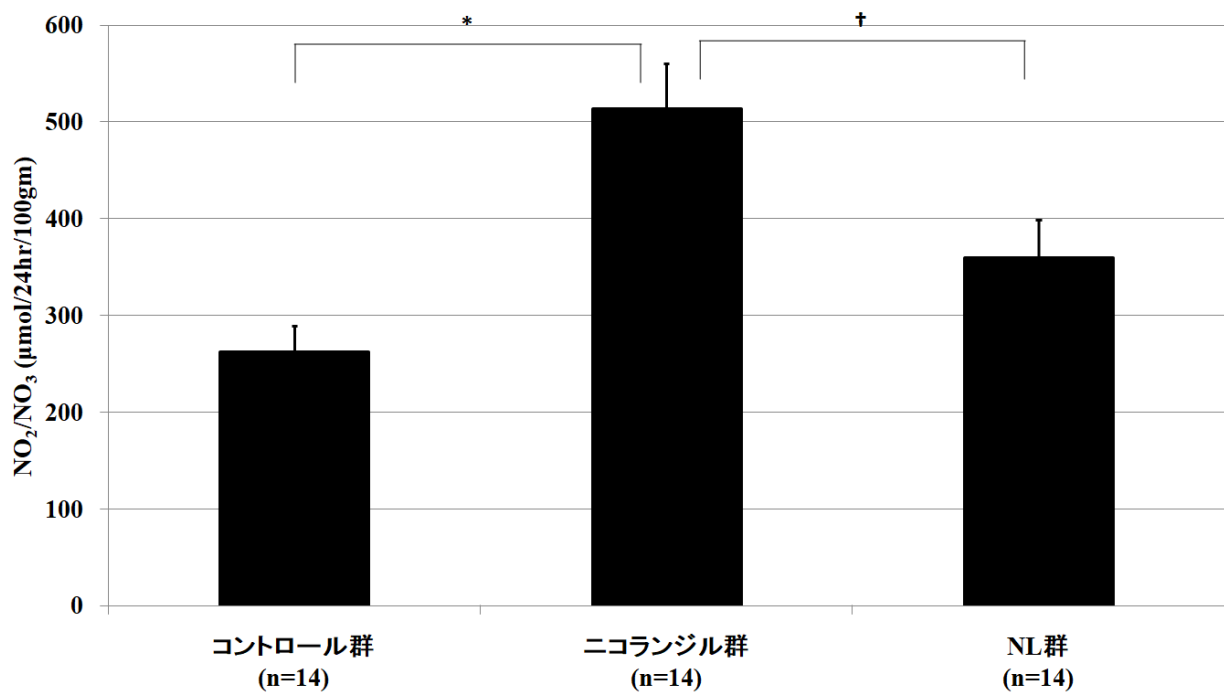


図 1. 尿中 NO₂/NO₃ 量. ニコランジル群ではコントロール群と比較し有意に 24 時間尿中の NO₂/NO₃ 量が高かった (514.1 ± 47.0 vs. 262.9 ± 26.5 μmol/24 hours per 100gm, **p*=0.0004)。さらに NL 群では、ニコランジル群と比較し NO₂/NO₃ 量が有意に低かった (360.2 ± 39.0 μmol/24 hours per 100gm, †*p*=0.0159)。

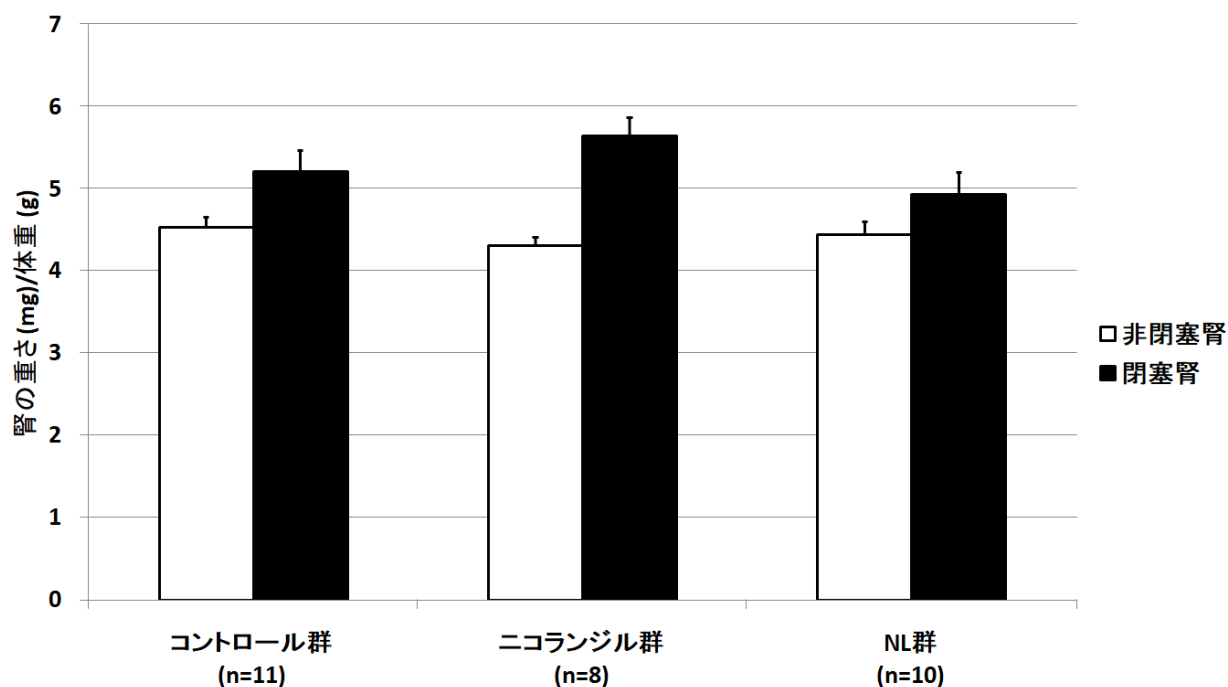


図 2. 腎重量. 腎摘出時の両側腎の重量(wet weight)を評価した。ニコランジル群とコントロール群との比較において、閉塞腎重量 (5.65 ± 0.22 vs. 5.21 ± 0.27 mg/g, $p = 0.302$) と非閉塞腎重量(4.317 ± 0.10 vs 4.54 ± 0.12 mg/g, $p = 0.5915$) との間に有意差を認めなかった。NL 群(閉塞腎: 4.94 ± 0.30 mg/g, 非閉塞腎: 4.45 ± 0.16 mg/g)とニコランジル群とを比較すると、統計学的有意差を認めなかったが(閉塞腎: $p = 0.0561$, 非閉塞腎: $p = 0.9292$)、閉塞腎においてはNL 群において腎重量が低くなる傾向が認められた。

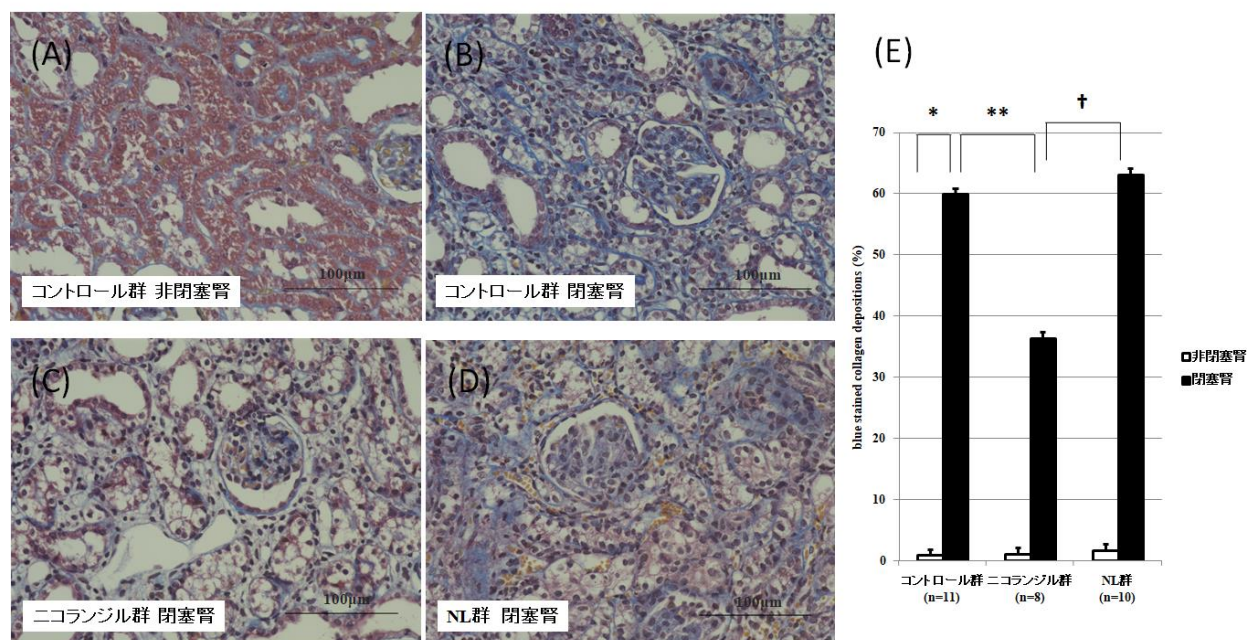


図 3. Masson's trichrome 染色. Masson's trichrome 染色において腎間質線維化の評価を行った。コントロール群において、閉塞腎(B)では非閉塞腎(A)と比較して間質線維化の有意に高度の線維化亢進を認めた (59.9 ± 3.21 vs. 0.90 ± 0.19 %, $*p < 0.0001$)。閉塞腎において、ニコランジル群(C)ではコントロール群(B)と比較し線維化の範囲(blue stained area)が有意に軽度であった (36.3 ± 3.2 vs. 59.9 ± 0.2 %, $**p = 0.0011$)。非特異的 NOS 阻害薬である L-NAME を投与した NL 群では、ニコランジル群と比較し有意に高度であった(D) (63.1 ± 3.0 %, $\dagger p = 0.0004$ 、対ニコランジル群)。E に 3 群の非閉塞腎と閉塞腎の線維化の範囲(blue stained area)を示す。

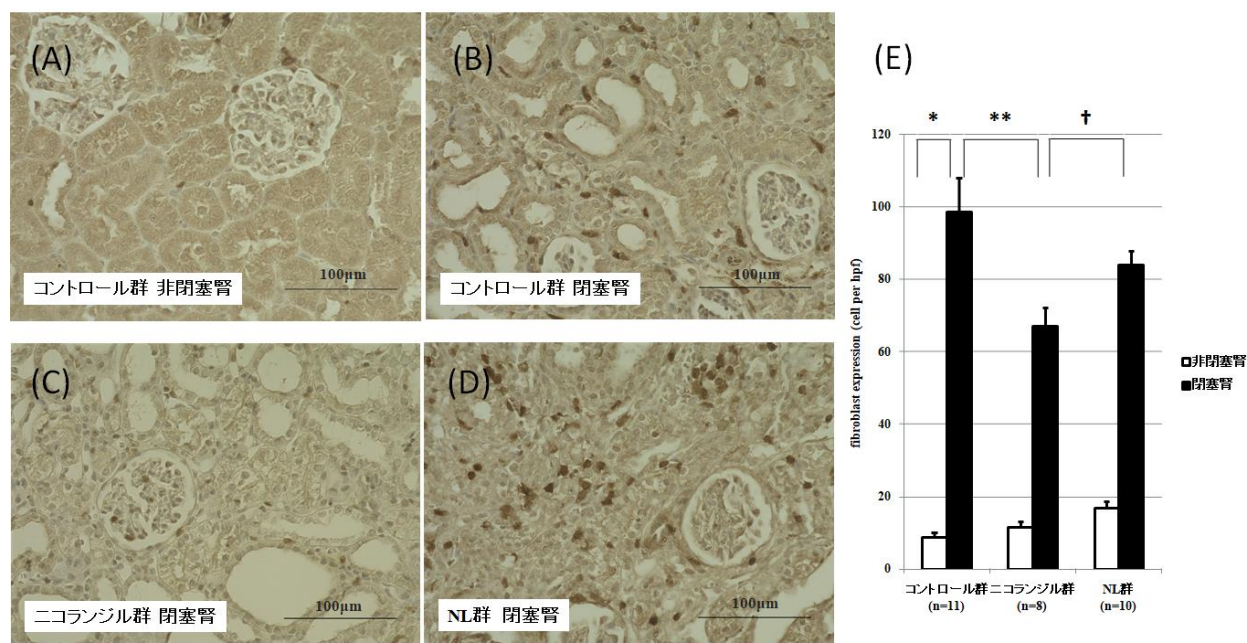


図 4. FSP-1 染色. Fibroblast-specific protein-1 (FSP-1)染色において線維芽細胞の評価を行った。コントロール群において、閉塞腎(B)では非閉塞腎(A)と比較して有意に FSP-1 陽性細胞数の高値を認めた (98.6 ± 9.30 vs. 8.81 ± 1.28 cells/hpf, $*p < 0.0001$)。閉塞腎において、ニコランジル群(C)ではコントロール群(B)と比較し、FSP-1 陽性細胞数の有意な低値を認めた (67.0 ± 5.3 vs. 98.6 ± 9.3 cells/hpf, $**p = 0.0093$)。NL 群の閉塞腎(D) (83.9 ± 3.8 cells/hpf) ではニコランジル群(C)と比較して FSP-1 陽性細胞数は有意に高値であった ($\dagger p = 0.0367$, 対ニコランジル群)。E に 3 群の非閉塞腎と閉塞腎における FSP-1 陽性細胞数を示す。

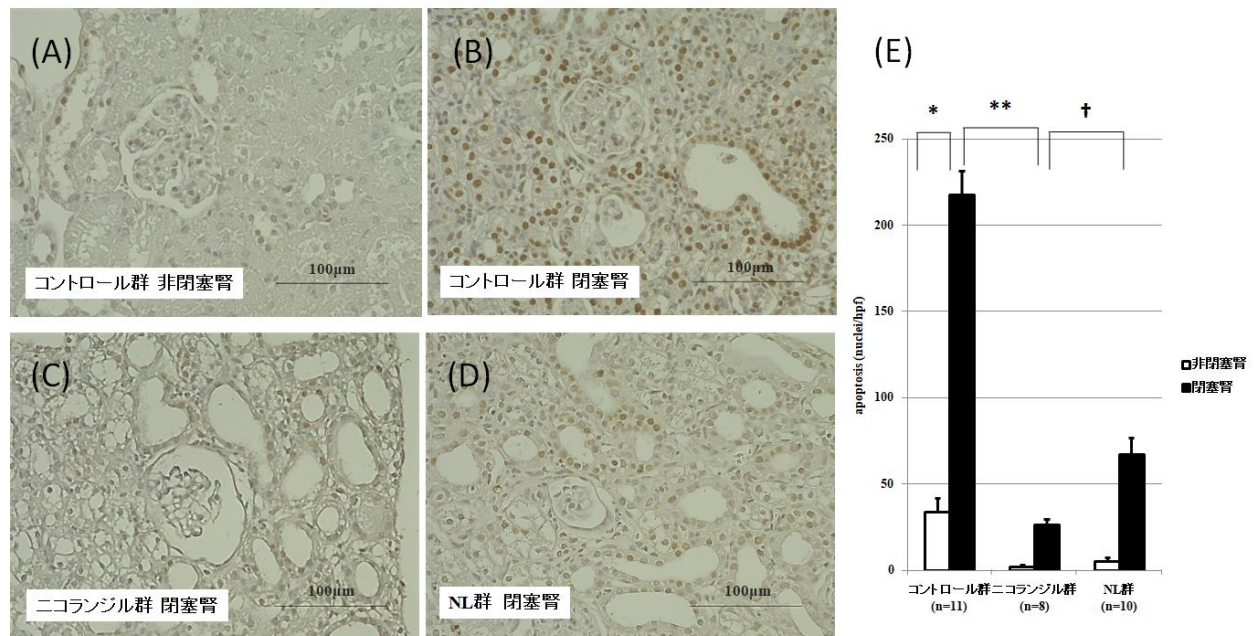


図 5. Single strand DNA (ssDNA)染色. ssDNA 染色において尿細管アポトーシスの評価を行った。コントロール群において、閉塞腎(B)では非閉塞腎(A)と比較して有意に ssDNA 陽性尿細管細胞数の高値を認めた (217.6 ± 13.6 vs. 33.9 ± 7.80 nuclei/hpf, $*p < 0.0001$)。閉塞腎において、ニコランジル群(C)ではコントロール群(B)と比較し ssDNA 陽性尿細管細胞数は有意に低値であった (26.5 ± 3.0 vs. 217.7 ± 7.8 nuclei/hpf, $**p = 0.0003$)。NL 群(D)(67.3 ± 9.0 nuclei/hpf)においてはニコランジル群(C)と比較し、ssDNA 陽性尿細管細胞数は有意に高値であった($\dagger p = 0.0004$ 、対ニコランジル群)。E に 3 群における非閉塞腎と閉塞腎の ssDNA 陽性尿細管細胞数を示す。

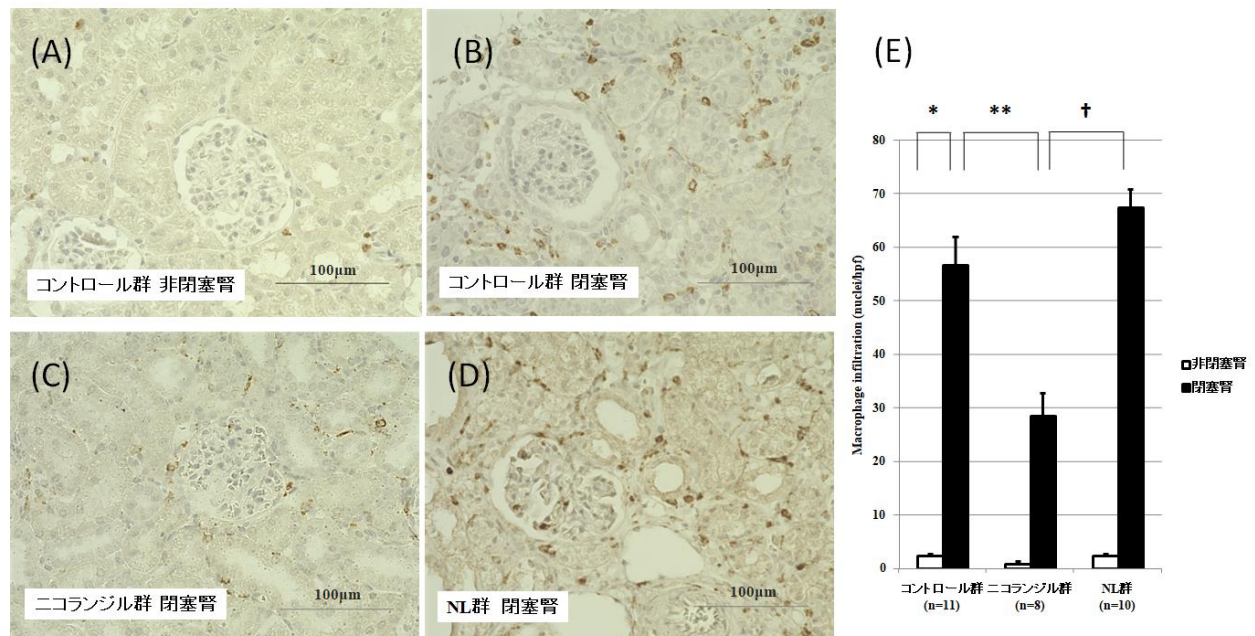


図 6. CD68 染色. 腎間質に浸潤するマクロファージを CD68 染色で評価した。コントロール群において、閉塞腎(B)では非閉塞腎(A)と比較して有意に CD68 陽性細胞数の高値を認めた (56.7 ± 5.29 vs. 2.34 ± 0.41 cells/hpf, $*p < 0.0001$)。閉塞腎において、ニコランジル群(C)ではコントロール群(B)と比較し CD68 陽性細胞数が有意に低値であった (28.6 ± 4.12 vs. 56.7 ± 0.41 cells/hpf, $**p = 0.0026$)。NL 群(D)ではニコランジル群(C)と比較し有意に高値であった (67.49 ± 3.38 cells/hpf, $\dagger p = 0.0006$, 対ニコランジル群)。E に 3 群における非閉塞腎と閉塞腎の CD68 陽性細胞数を示す。

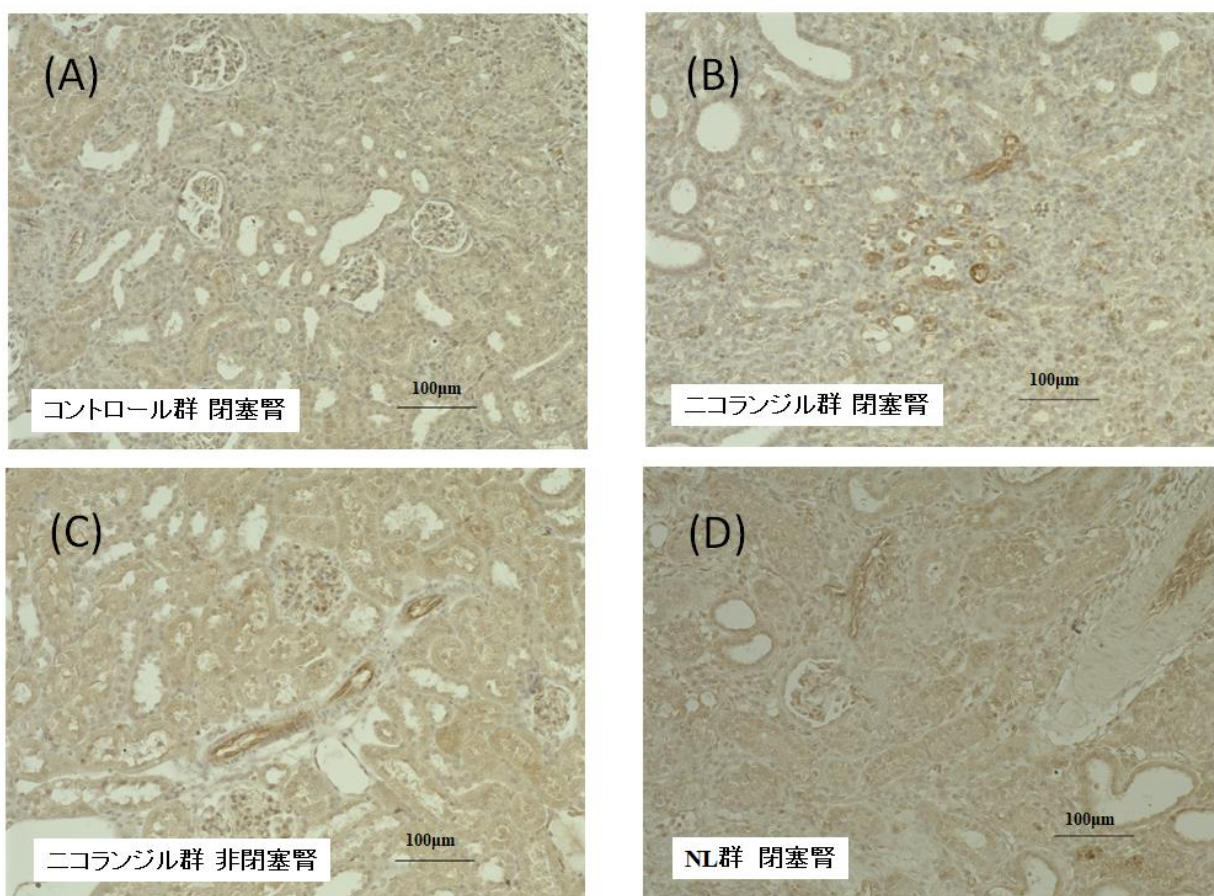


図 7.eNOS 免疫染色. NOS 2 (induced NOS; iNOS)及び NOS 3 (endothelial NOS; eNOS)染色の発現を、コントロール群およびニコランジル群について免疫組織染色で評価した。iNOS では両群ともに明らかな発現の変化を認めなかった。コントロール群においては非閉塞腎(data not shown)と閉塞腎(A)において eNOS が強く発現する構造物を認めなかった。閉塞腎における eNOS の免疫染色においてはニコランジル群の閉塞腎(B)および非閉塞腎(C)において血管内皮細胞に eNOS の強い発現を認めた。NL 群においても閉塞腎(D)の血管内皮細胞に強い発現を認めた。またニコランジル群においては非閉塞腎の血管内皮細胞においても発現強度が上昇している所見が認められた。

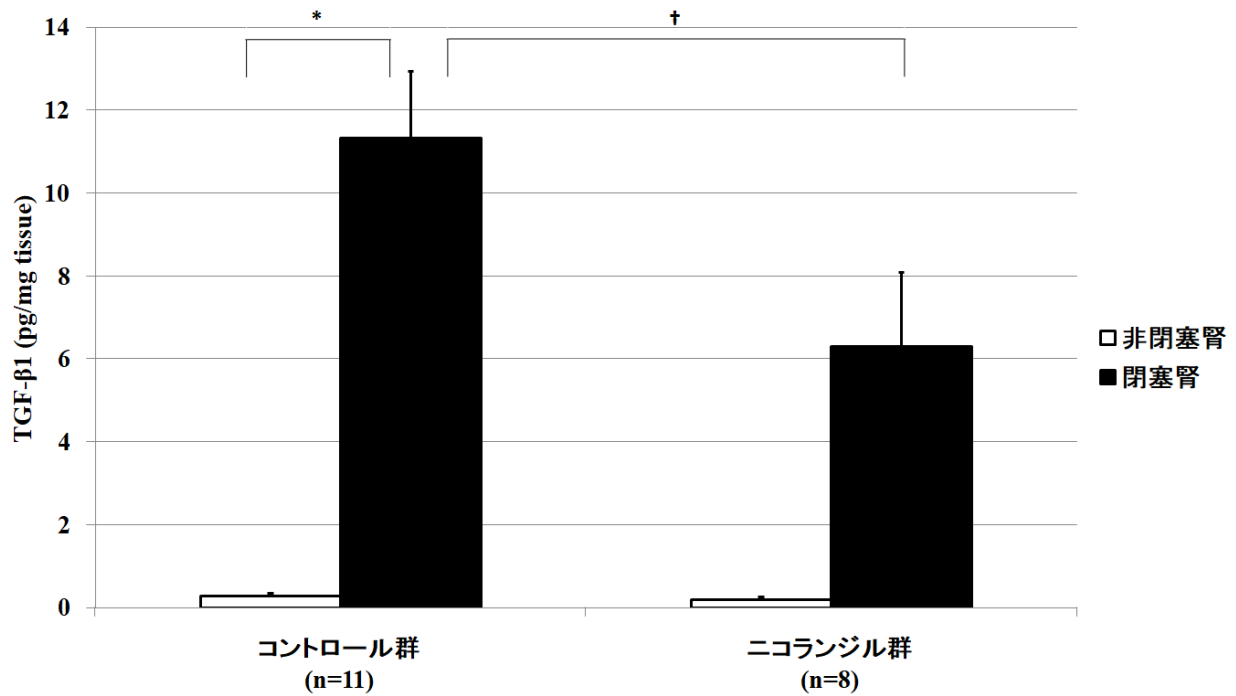


図 8. 腎組織中 TGF-β1. 腎組織中の TGF-β1 を ELISA 法を用いて測定した。コントロール群においては非閉塞腎と比較し閉塞腎において著明に組織中 TGF-β1 量の高値を認めた (11.3 ± 1.62 vs. 0.30 ± 0.05 pg/mg tissue, $*p < 0.0001$)。次に閉塞腎においてニコランジル群とコントロール群を比較した。コントロール群と比較し、ニコランジル投与群においては腎組織中の TGF-β1 量は有意に低値であった (6.31 ± 1.79 vs. 11.3 ± 1.62 pg/mg tissue, $\dagger p = 0.0232$)。

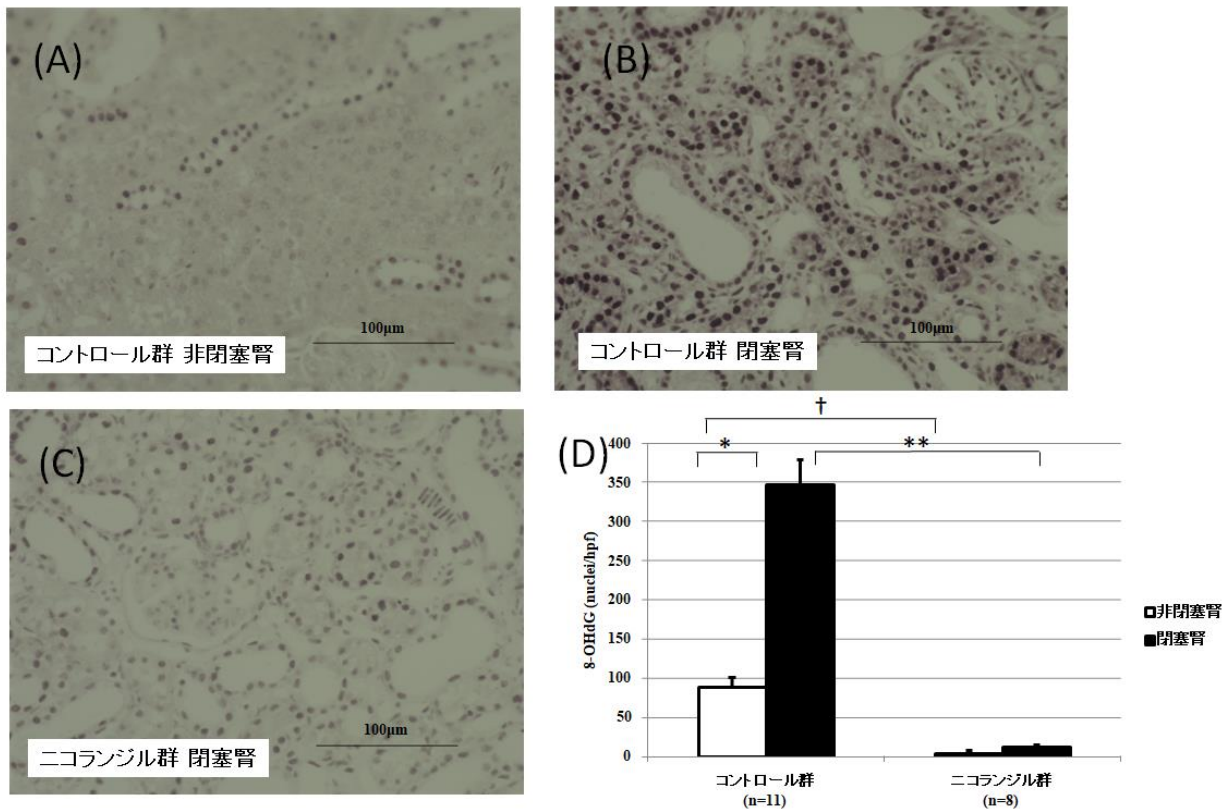


図 9. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)染色（核酸酸化ストレスマーカー）．尿細管細胞における核酸の酸化ストレスを 8-OHdG 染色を用いて評価した。コントロール群において、閉塞腎(B) (348.1 ± 32.1 nuclei/hpf) は非閉塞腎(A) (88.2 ± 13.6 nuclei/hpf) と比較して有意に 8-OHdG 陽性細胞数の高値を認めた ($*p<0.0001$)。閉塞腎において、ニコランジル群(C) (11.6 ± 3.8 nuclei/hpf) はコントロール群(B) (348.1 ± 32.1 nuclei/hpf) と比較し、8-OHdG 陽性細胞数の有意に低値であった ($**p=0.0003$)。D にコントロール群およびニコランジル群の非閉塞腎と閉塞腎の 8-OHdG 陽性細胞数を示す。非閉塞腎においても、ニコランジル群 (4.1 ± 3.2 nuclei/hpf) はコントロール群 (88.2 ± 13.6 nuclei/hpf) と比較し、8-OHdG 陽性細胞数が有意に低値であった ($\dagger p=0.0004$)。

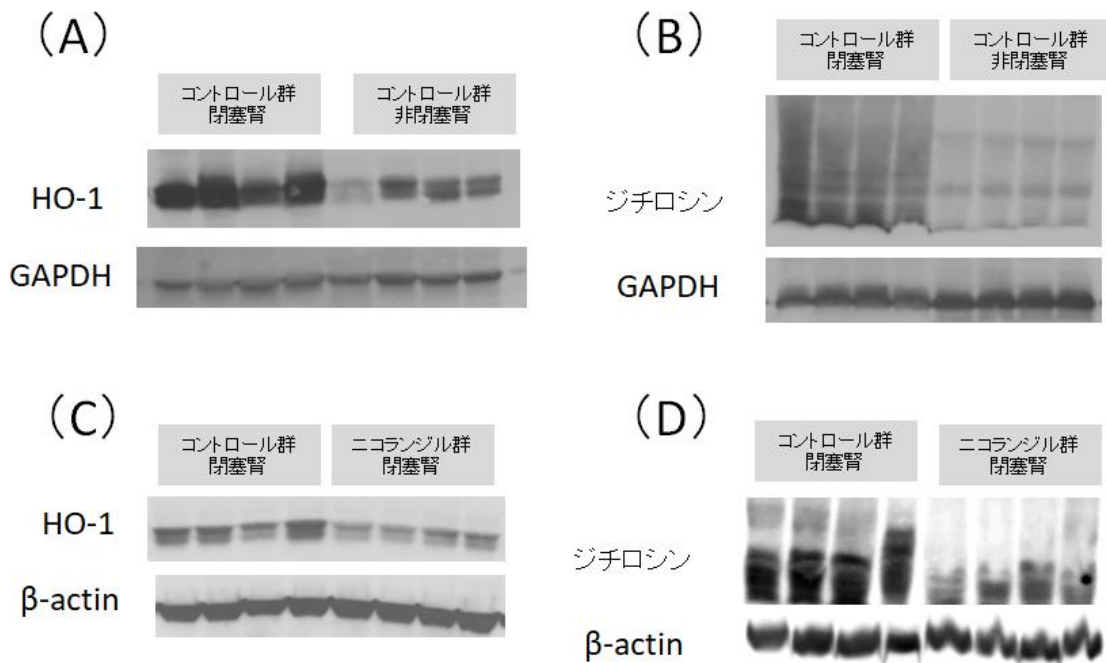


図 10. ウェスタンブロット（抗 HO-1 抗体及び抗ジチロシン抗体）．非閉塞腎および閉塞腎における酸化ストレスを抗 HO-1 抗体及び抗ジチロシン抗体を用いたウェスタンブロットで評価した。A: コントロール群において閉塞腎(n=4)では非閉塞腎(n=4)と比較し HO-1 が強く発現した。B: コントロール群において閉塞腎(n=4)では非閉塞腎(n=4)と比較し抗ジチロシン抗体が結合するタンパク質が強く発現した。C: コントロール群とニコランジル群の閉塞腎における HO-1 の発現の比較。ニコランジル群ではコントロール群と比較し HO-1 が弱く発現した。D: コントロール群とニコランジル群の閉塞腎における抗ジチロシン抗体に結合する蛋白の比較。ニコランジル群ではコントロール群と比較しジチロシン結合蛋白の発現が弱く発現した。